

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Fisiología Animal II



## TESIS DOCTORAL

**Caracterización de marcadores inmunológicos y de estrés oxidativo en  
el envejecimiento humano y en un modelo de Alzheimer en ratón**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Ianire Mate Otaño**

Directora

Mónica de la Fuente del Rey

**Madrid, 2015**

**Departamento de Fisiología Animal II. FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES INMUNOLÓGICOS Y  
DE ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ENVEJECIMIENTO HUMANO Y  
EN UN MODELO DE ALZHEIMER EN RATÓN**

**Tesis Doctoral**

**IANIRE MATE OTAÑO**

**Madrid, 2015**



**MÓNICA DE LA FUENTE DEL REY**, Catedrática de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, **AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES INMUNOLÓGICOS Y DE ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ENVEJECIMIENTO HUMANO Y EN UN MODELO DE ALZHEIMER EN RATÓN**”, realizada por **IANIRE MATE OTAÑO**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 26 de Enero de 2015

**VºBº de la Directora de Tesis**

**Dra. Mónica de la Fuente Del Rey**

**Ianire Mate Otaño**



La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo con el apoyo económico prestado por los proyectos BFU2008-04336 y BFU2011-30336 del actual Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), de la Red de Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) (RD06/0013/0003; RD12/0043/0018) del Instituto de Salud Carlos III, del grupo UCM-CM: Envejecimiento, Neuroinmunología y Nutrición (ENEROINN) (N° 910379), y con la concesión a Ianire Mate Otaño de una beca para la formación de personal investigador del Gobierno Vasco (BFI09-52).



*“Los mares en calma no hacen buenos marineros”*

Proverbio inglés





Por fin ha llegado, y no me lo creo. Es el momento de imprimir este manuscrito y agradecer a todas aquellas personas que han contribuido de una u otra forma a la realización de este proyecto y a que toque su fin. Ha sido muy duro, inspiro profundamente, y me siento muy satisfecha.

Quisiera comenzar expresando mi más profundo agradecimiento a una de las personas que más ha influido en mí en los últimos años. Mónica, millones de gracias por tu ayuda, apoyo y confianza. Por tu simpatía, tu positividad, tu saber hacer y tu paciencia. Por hacer fácil aquello que parecía imposible. Por tu sabiduría y experiencia. Gracias por estar dispuesta a escucharme en todo momento y por hacer que aun entrando hecha polvo a tu despacho saliera llena de confianza en mí misma. Por tu empatía. Gracias Mónica por dejarme crecer contigo.

A todos mis compañeros del laboratorio, tanto los que lo fueron como los que lo son. A Lorena, por haber sido un referente para mí. A Isa, Saripún (chin pun), Julito, Ada, Mateo y Carlos, con vosotros sí que era una gozada venir al laboratorio. A Rashed, por enseñarme un mundo nuevo. A Nuria-mami Nur, y Oskarina la chamita, por vuestro compañerismo. Mucho ánimo a las dos, todo se consigue. A Julita, por todas tus cualidades sorprendentes y ser tan divertida. Porque se disfruta trabajando contigo, y eso lo facilita todo. Y sobre todo, por ser una gran amiga. A Carmen, por ser una de las mejores personas que conozco, trabajadora y gran compañera ¡¡Qué gran corazón tienes Carmencita!! Gracias a las dos, Julia y Carmen, por estar junto a mí siempre, desde que comenzamos nuestra andadura científica. A Garrido, por ser un tío tan único y el actual macho alfa del laboratorio. Qué a gusto se discute contigo Garri. Por todas tus teorías disparatadas. A aquellas personas que han llegado en el momento de mi retiro monacal para escribir la tesis. Mucho ánimo para Carol, Idoia e Irene, espero que tengáis mucha suerte. Compañeros, me siento encantada de haberos conocido ¡¡familia!!

A todas aquellas personas del departamento que me han ayudado, especialmente a Ana, porque contigo hacer papeleos es hasta divertido. A Teresa de la mañana y Teresa de la tarde. No quiero olvidarme de Julia, por ser la limpiadora más alegre y simpática que tuvo el departamento, y por los chorizos que nos traía cada vez que se presentaba una excusa.

A mis biólogos favoritos, Carliños, Merys, Cristinita, Jorgito, Esti, Beñat, Cris tele, Carmela y Sara ¡¡Qué vacío está Madrid sin vosotros!! Ojalá algún día podáis volver... Se os echa

mucho de menos. Gracias Charliños por ser mi amigo, por ayudarme siempre a desconectar y ser tan grande. A *Marqués* también gracias, por supuesto.

A Óscar y Fleki, porque quedar con vosotros ha sido siempre una aventura.

A Agustín y Nerea, *Bilboko garaiengatik*, y a Ilargi por haber sido la mejor compañera en la transición Bilbo - Madrid. Da igual que estés lejos Ilar, estás siempre muy presente en mí.

A mi cuadrilla, Itziar, Maider, Ione, Amaia, Edurne *eta* Ainhoa, *urrutian baina beti gertu bihotzean... Mila esker kuadrila!*

A Lagartera y a su gente maravillosa. A Paquita y Jesús, por hacerme sentir como en casa. A Noelina, Mirinchina, Elsitita y Alvarito, por llenar mi corazón. A Merce, Iván, Boti, PabloOOOoOoOOO, Mamen y toda la cuadrilla, por acogerme como a una más.

A toda mi familia, toda. A mis tíos y primos. Por sentirlos siempre tan cerca. *Eskerrik asko guztioi*. A mi amama y mi aitita, porque aunque no estéis físicamente entre nosotros, lo estáis en nuestros pensamientos y corazones. *Gogoan zaituztet*. A mis hermanos Iñigo *eta* Uxue, *munduko anai-arrebarik hoberenak!!* Los mejores en todos los sentidos. Por haber sido mis primeros profesores y haberme mimado siempre tanto. A Unai, *zu bai koinatu itzela*. A mis sobrinos Jon *eta* Aitzol, por ser la alegría de la casa, y porque comerlos a besos es uno de los mayores placeres de esta vida. *Muxu pila nire txikixek!!* Y especialmente a mi ama y mi aita, por ser los mejores. Por haberme apoyado siempre incondicionalmente. Porque sin vosotros, esto hubiera sido imposible. *Asko maite zaituztet!!*

Y, finalmente, a la persona que ha soportado estoicamente todos los arrebatos tésicos que he sufrido a lo largo de la escritura del presente manuscrito. Dani, gracias por haber estado junto a mí en este trance. Por tu cariño, ánimo y comprensión, y por tu implacabilidad a la hora de separar el trabajo del resto de las cosas. Por creer que soy la mejor. Esta tesis es también tuya. *Eskerrik asko Danitxu!!*

*Mila esker guztioi!* ¡Muchas gracias a todos!

A mi ama y mi aita, *maitasun handiz*.

## ABREVIATURAS

3xTgAD	Triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer.
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.
A $\beta$	Beta amiloide.
ACTH	Hormona adrenocorticotropa (del inglés, <i>adrenocorticotropic hormone</i> ).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AGE	Productos de glicación avanzada (del inglés, <i>Advanced Glication End products</i> ).
AP-1	Proteína activadora 1.
APC	Alofocianina.
APP	Proteína precursora amiloide.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
BCA	Ácido bicinconínico.
BHE	Barrera hematoencefálica.
BSA	Albúmina de suero bovino.
CAT	Catalasa.
CCL	Ligando de quimioquina con motivos C-C.
CD	Complejo de diferenciación (del inglés, <i>Cluster of Differentiation</i> ).
ConA	Concanavalina A.
COX-2	Ciclooxigenasa 2.
Cpm	Cuentas por minuto.
CRH	Hormona liberadora de corticotropina (del inglés, <i>Corticotropin-Releasing Hormone</i> ).
CXCL	Ligando de quimioquina con motivos C-X-C.
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico.
EA	Enfermedad de Alzheimer.
EF	Eficacia de fagocitosis.
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (del inglés, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ).
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
ERK	Quinasas reguladas por señalización extracelular (del inglés, <i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i> ).

FEV <sub>1</sub>	Volumen espirado máximo en el primer segundo (del inglés, <i>Forced Expiratory Volume in the 1<sup>st</sup> second</i> ).
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
fMLP	Péptido formilado o N-Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (f-Met-Leu-Phe).
FVC	Capacidad vital forzada (del inglés, <i>Forced Vital Capacity</i> ).
GDS	Escala de depresión geriátrica (del inglés, <i>Geriatric Depression Scale</i> ).
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés, <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> ).
GOLD	Iniciativa Global de la EPOC (del inglés, <i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i> ).
GR	Glutatión reductasa.
GSH	Glutatión reducido.
GSSG	Glutatión disulfuro o glutatión oxidado.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno.
HHA	(eje) Hipotálamo-hipófisis-adrenal.
HNE	4-hidroxi-2,3-nonenal.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> ).
IA	Índice de adherencia.
IF	Índice de fagocitosis.
IFN	Interferon.
IL	Interleuquina.
IMC	Índice de masa corporal.
IP3	Inositol trifosfato.
IQ	Índice de quimiotaxis.
IRP	Fenotipo de riesgo inmunitario (del inglés, <i>Immunological Risk Phenotypes</i> ).
Jak-STAT	(vía de señalización) Jak-STAT (del inglés, <i>Janus kinase (JAK) y Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)</i> ).
LDL	Lipoproteína de baja densidad (del inglés, <i>Low-Density Lipoprotein</i> ).
LFA-1	Antígeno asociado a la función de linfocitos (del inglés, <i>Lymphocyte Function associated Antigen-1</i> ).
LPS	Lipopolisacárido (de la membrana de <i>E. coli</i> ).
Mac-1	Antígeno de macrófago-1 (del inglés, <i>Macrophage-1 antigen</i> ).
MAPK	Quinasas activadas a través de mitógeno (del inglés, <i>Mitogen activated protein kinases</i> , MAP kinasas).

MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (=CCL2).
MDA	Malondialdehído.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, <i>Major histocompatibility complex</i> ).
MIF	Factor de inhibición migratoria de macrófagos (del inglés, <i>Macrophage migration inhibitory factor</i> ).
MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófagos-2 (=CXCL2).
MMSE	Mini examen del estado mental (del inglés, <i>Mini-Mental State Examination</i> ).
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida.
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B.
NK	Asesinas naturales (del inglés, <i>Natural Killer</i> ).
NPV	Núcleo paraventricular.
NSQ	Núcleo supraquiasmático.
NTg	No transgénico.
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Anión superóxido.
OH <sup>·</sup>	Radical hidróxilo.
ONF	Ovillos neurofibrilares.
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica (del inglés, <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> ).
PCR	Proteína C reactiva.
PE	Ficoeritrina.
PerCP	Peridínclorofil.
PHA	Fitohemaglutinina.
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa.
PKC1	Proteína quinasa C 1.
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato.
PMN	Polimorfonuclear.
PS	Presenilina.
<i>r</i>	Coeficiente de correlación.
RIA	Radioinmunoensayo.
RIC	Rango intercuartil.
RNS	Especies reactivas de nitrógeno.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
SNA	Sistema nervioso autónomo.

SNC	Sistema nervioso central.
SOD	Superóxido dismutasa.
sTNF-RI/-RII	Receptor soluble I o II de TNF.
TAC	Capacidad antioxidante total (del inglés, <i>Total Antioxidant Capacity</i> ).
TCA	Ácido tricloroacético.
TCR	Receptor antígeno-específico de las células T.
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$ (del inglés, <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> ).
Th	Linfocito T helper o cooperador.
TLR	Receptor de tipo Toll (del inglés, <i>Toll-like receptor</i> ).
TMB	Tetrametilbenzidina.
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa.
XO	Xantina oxidasa.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>25</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>33</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>41</b>
1.1. EL ENVEJECIMIENTO.....	41
1.1.1. Definición y características del envejecimiento.....	41
1.1.2. ¿Cómo, dónde y por qué envejecemos?. Una teoría integradora del envejecimiento.....	42
1.1.3. El concepto de “edad biológica” .....	47
1.1.4. Envejecimiento y fragilidad.....	48
1.1.5. El envejecimiento del sistema inmunitario: La inmunosenescencia.....	50
1.1.5.1. Cambios en las poblaciones leucocitarias con la edad.....	51
1.1.5.2. Cambios funcionales en el sistema inmunitario con la edad.....	54
<i>La inmunidad innata</i> .....	56
<i>La inmunidad adaptativa</i> .....	61
<i>Las citoquinas</i> .....	64
1.1.6. La oxidación-inflamación como causa y efecto de la inmunosenescencia.....	72
1.1.7. El sistema inmunitario como marcador de edad biológica y predictor de longevidad.....	77
1.1.8. Un envejecimiento saludable o exitoso: Los individuos que alcanzan una gran longevidad.....	81
1.1.9. La comunicación neuroinmunoendocrina y su modificación en el envejecimiento.....	85
1.2. LA CRONOBIOLOGÍA.....	88
1.2.1. Los ritmos biológicos.....	88
1.2.1.1. Los ritmos circadianos.....	89
1.2.1.2. Los ritmos circanuales o las variaciones estacionales.....	96
1.2.2. Los ritmos biológicos y su relación con el envejecimiento.....	99
1.3. PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON LA OXIDACIÓN E INFLAMACIÓN Y ESTADO DEL SISTEMA INMUNITARIO.....	101
1.3.1. La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica y el sistema inmunitario.....	101



1.3.2. La Enfermedad de Alzheimer y el sistema inmunitario.....	109
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>121</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>129</b>
3.1. MATERIAL.....	129
3.1.1. Material biológico.....	129
3.1.1.1. Humanos.....	129
3.1.1.2. Animales.....	129
3.1.1.3. Líneas celulares.....	130
3.1.2. Medios de cultivo y soluciones salinas.....	130
3.1.2.1. Soluciones salinas preparadas en el laboratorio con agua ultrapura.....	130
3.1.2.2. Medios comerciales.....	131
3.1.3. Reactivos y kits comerciales.....	131
3.1.4. Material de laboratorio.....	133
3.1.5. Aparataje.....	134
3.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	135
3.2.1. Protocolos experimentales en humanos.....	135
3.2.1.1. Estudio del efecto de la edad sobre la funcionalidad de células inmunitarias, el estado de inflamación y de estrés oxidativo en mujeres y hombres.....	135
3.2.1.2. Estudio del efecto de los ritmos biológicos sobre la funcionalidad de las células inmunitarias con el envejecimiento.....	137
1) Estudio de los cambios en la funcionalidad de las células inmunitarias en dos horas distintas del día.....	137
2) Estudio de los cambios en la funcionalidad de las células inmunitarias a lo largo de las distintas estaciones del año.....	138
3.2.1.3. Estudio de la funcionalidad de las células inmunitarias, la inflamación y el estrés oxidativo en una población nonagenaria como modelo de envejecimiento saludable.....	138
3.2.1.4. Estudio de la relación entre la capacidad antioxidante total y diversos índices funcionales y estados patológicos en una población mayor de 65 años....	140
3.2.1.5. Estudio de la funcionalidad de las células inmunitarias y las defensas antioxidantes en hombres con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).....	141
3.2.2. Diseño en animales de experimentación: ratones.....	142

3.2.2.1. Estudio longitudinal de las poblaciones, funcionalidad y estado de estrés oxidativo de células inmunitarias peritoneales de ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer.....	142
3.3. MÉTODOS.....	144
3.3.1. Métodos en muestras humanas de sangre periférica.....	144
3.3.1.1. Obtención de leucocitos, de plasma, de plasma de sangre periférica estimulada o no en presencia de LPS. Recuento y viabilidad celular.....	144
3.3.1.2. Estudio de las funciones en células inmunitarias.....	146
3.3.1.3. Estudio de los niveles de citoquinas y sus receptores solubles.....	154
3.3.1.4. Estudio de compuestos pro- y anti-inflamatorios plasmáticos.....	159
3.3.1.5. Estudio de compuestos oxidantes y defensas antioxidantes.....	160
3.3.1.6. Valoración del daño oxidativo. 8-isoprostano.....	166
3.3.2. Métodos en ratones.....	167
3.3.2.1. Obtención de leucocitos peritoneales. Recuento y viabilidad celular.....	167
3.3.2.2. Análisis de las subpoblaciones celulares presentes en las suspensiones peritoneales.....	168
3.3.2.3. Estudio de las funciones de células inmunitarias.....	169
3.3.2.4. Estudio de compuestos oxidantes y defensas antioxidantes.....	171
3.3.2.5. Estudio de longevidad.....	173
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	173
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>179</b>
4.1. ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DEL SISTEMA INMUNITARIO. CAMBIOS CON LA EDAD EN LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EN PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y OXIDACIÓN.....	179
4.1.1. Cambios con la edad en las funciones de neutrófilos: Adherencia, movilidad espontánea, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares.....	179
4.1.2. Cambios con la edad en las funciones de linfocitos: Adherencia, movilidad espontánea, quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	183
4.1.3. Valoración de citoquinas y algunos de sus receptores solubles en diversas muestras biológicas.....	186
4.1.3.1. Niveles de IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares estimuladas con PHA.....	186

4.1.3.2. Niveles de IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-10 en plasma procedente de sangre estimulada previamente en ausencia/presencia de LPS.....	190
4.1.3.3. Niveles de sIL-6R, sTNF-RI y sTNF-RII en plasma procedente de sangre estimulada previamente con LPS.....	192
4.1.4. Valoración de compuestos pro- y anti-inflamatorios plasmáticos.....	194
4.1.4.1. Niveles de PCR, IL-6 y sIL-6R.....	194
4.1.4.2. Niveles de IL-10, sTNF-RI y -RII.....	197
4.1.5. Valoración de compuestos oxidantes y defensas antioxidantes.....	198
4.1.5.1. Oxidantes: Contenido de GSSG y cociente GSSG/GSH en neutrófilos y linfocitos, y actividad xantina oxidasa plasmática.....	198
4.1.5.2. Defensas antioxidantes: Niveles de GSH en neutrófilos y linfocitos, glutatión total en plasma, y capacidad antioxidante total en plasma y células sanguíneas.....	202
4.1.6. Daño oxidativo: Niveles de 8-isoprostano en plasma.....	205
4.2. RITMOS BIOLÓGICOS EN EL SISTEMA INMUNITARIO.....	207
4.2.1. Cambios en la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica en dos horas distintas del día.....	207
4.2.1.1. Cambios en las funciones de neutrófilos: Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares.....	207
4.2.1.2. Cambios en las funciones de linfocitos: Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	209
4.2.2. Cambios en la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica a lo largo de las distintas estaciones del año.....	212
4.2.2.1. Cambios en las funciones de neutrófilos: Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares.....	212
4.2.2.2. Cambios en las funciones de linfocitos: Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	216
4.3. ENVEJECIMIENTO SALUDABLE: ESTUDIO DE UNA POBLACIÓN NONAGENARIA. CAMBIOS CON LA EDAD EN LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EN PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y DE DEFENSA ANTIOXIDANTE EN PLASMA.....	219
4.3.1. Cambios con la edad en las funciones de neutrófilos: Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares.....	219
4.3.2. Cambios con la edad en las funciones de linfocitos: Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	223

4.3.3. Valoración de los niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10, en diversas muestras biológicas.....	225
4.3.3.1. Sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA.....	226
4.3.3.2. Plasma procedente de sangre incubada previamente en ausencia/presencia de LPS.....	230
4.3.3.3. Plasma.....	237
4.3.4. Valoración de la proteína C reactiva (PCR), glutatión total y capacidad antioxidante total en plasma.....	240
4.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL Y SU RELACIÓN CON DIVERSOS ÍNDICES FUNCIONALES Y PATOLOGÍAS.....	242
4.5. ENVEJECIMIENTO PREMATURO. CAMBIOS EN LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EN LOS NIVELES DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN HOMBRES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC) MODERADA Y SEVERA.....	249
4.5.1. Capacidad funcional de neutrófilos: Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares.....	249
4.5.2. Capacidad funcional de linfocitos: Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	251
4.5.3. Citoquinas: Niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10.....	252
4.5.4. Defensas antioxidantes: Glutatión total en neutrófilos y linfocitos, y capacidad antioxidante total plasmática.....	253
4.6. ENVEJECIMIENTO PATOLÓGICO. ESTUDIO LONGITUDINAL EN EL MODELO MURINO TRIPLE TRANSGÉNICO (PS1 <sub>M146V</sub> , APP <sub>SWE</sub> , TAU <sub>P301L</sub> ) PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	255
4.6.1. Peso de los animales.....	255
4.6.2. Caracterización y cuantificación de poblaciones leucocitarias peritoneales....	256
4.6.2.1. Caracterización y cuantificación de macrófagos y células <i>Natural Killer</i> (NK).....	257
4.6.2.2. Caracterización y cuantificación de linfocitos B y T.....	258
4.6.3. Capacidad funcional de los leucocitos peritoneales.....	261
4.6.3.1. Capacidad funcional de macrófagos: Quimiotaxis y fagocitosis.....	261
4.6.3.2. Capacidad funcional de los linfocitos: Quimiotaxis, proliferación y actividad NK.....	264

4.6.4. Niveles de compuestos oxidantes y defensas antioxidantes.....	268
4.6.4.1. Oxidantes: Contenido de GSSG, cociente GSSG/GSH y actividad de la xantina oxidasa en leucocitos.....	268
4.6.4.2. Defensas antioxidantes: Contenido de GSH y actividad de la catalasa en leucocitos.....	270
4.6.5. Esperanza de vida media.....	272
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>275</b>
5.1. ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DEL SISTEMA INMUNITARIO. CAMBIOS CON LA EDAD EN LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EN PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y OXIDACIÓN.....	275
5.1.1. Cambios con la edad en la funcionalidad de los leucocitos de sangre periférica.....	276
5.1.2. Cambios con la edad en la liberación de citoquinas y algunos receptores solubles.....	282
5.1.3. Cambios con la edad en parámetros de estado inflamatorio y redox.....	293
5.1.4. Diferencias de género en los parámetros estudiados y discusión general.....	300
5.2. RITMOS BIOLÓGICOS EN EL SISTEMA INMUNITARIO.....	303
5.2.1. Cambios en las funciones de neutrófilos y linfocitos de sangre periférica de jóvenes y septuagenarios, en dos horas distintas del día.....	304
5.2.2. Cambios en las funciones de neutrófilos y linfocitos de sangre periférica de adultos y maduros, a lo largo de las distintas estaciones del año.....	312
5.3. ENVEJECIMIENTO SALUDABLE: ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DE PARÁMETROS PLASMÁTICOS DE INFLAMACIÓN Y DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN UNA POBLACIÓN DE HOMBRES Y MUJERES NONAGENARIOS.....	317
5.3.1. Caracterización de las funciones de neutrófilos y linfocitos de mujeres y hombres nonagenarios en comparación con adultos y maduros.....	318
5.3.2. Caracterización de los niveles de citoquinas secretadas en diversas localizaciones biológicas de mujeres y hombres nonagenarios en comparación con adultos y septuagenarios.....	322
5.3.3. Caracterización de los niveles plasmáticos del marcador de inflamación proteína C reactiva, y de defensas antioxidantes de mujeres y hombres nonagenarios en comparación con adultos y maduros.....	337
5.3.4. Diferencias de género en los parámetros estudiados y discusión general.....	339

5.4. ESTADO ANTIOXIDANTE ASOCIADO A DIFERENTES CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES Y PATOLOGÍAS EN MUJERES Y HOMBRES MAYORES DE 65 AÑOS.....	343
5.5. ENVEJECIMIENTO PREMATURO ASOCIADO A UNA PATOLOGÍA. CAMBIOS EN LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EN LOS NIVELES DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN HOMBRES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC) MODERADA Y SEVERA.....	352
5.6. ENVEJECIMIENTO PATOLÓGICO. ESTUDIO LONGITUDINAL EN EL MODELO MURINO DE TRIPLE TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	362
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>377</b>
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>383</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>447</b>
Anexo I.....	447
Anexo II.....	455



# Resumen





## **CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES INMUNOLÓGICOS Y DE ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ENVEJECIMIENTO HUMANO Y EN UN MODELO DE ALZHEIMER EN RATÓN**

El envejecimiento es un proceso universal, progresivo, intrínseco y deletéreo, que se caracteriza por su gran heterogeneidad, debido a que no todos los cambios fisiológicos de los diversos sistemas de un organismo cambian con la edad a la misma velocidad, ni tampoco lo hacen los distintos individuos con una misma edad cronológica. El envejecimiento también afecta al sistema inmunitario (SI), cuya funcionalidad, al avanzar la edad, se modifica y deteriora, lo que se conoce como inmunosenescencia, dando paso a un aumento en la susceptibilidad y severidad a/de infecciones así como en la incidencia de fenómenos autoinmunes y cáncer. La inmunosenescencia, lleva consigo la alteración de las distintas subpoblaciones y funciones de los leucocitos, que abarcan tanto la inmunidad innata como la adaptativa, así como de la red de citoquinas. Además, acorde con la teoría de la oxidación propuesta por Harman en 1956 para explicar cómo se produce el envejecimiento, las células inmunitarias muestran un estrés oxidativo, debido al aumento de oxidantes y/o a la disminución de defensas antioxidantes, lo que explicaría el deterioro de su estado funcional asociado al avance de la edad. Los estudios realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado un papel clave del SI en cuanto a que éste podría reflejar y modificar la velocidad a la que el envejecimiento se produce, esto es, la edad biológica de cada individuo. Así, se ha propuesto una amplia batería de parámetros de capacidad funcional de las células inmunitarias, no sólo como indicadores de salud y longevidad, sino también como herramienta para medir esa edad biológica. De hecho, se ha comprobado que los centenarios conservan de manera óptima la funcionalidad y la homeostasis redox de sus leucocitos, siendo semejantes a las de los individuos adultos, aspectos que podrían ser los responsables de la elevada longevidad que alcanzan. Otros factores que pueden modificar el SI, son los ritmos circadianos y los circanuales, los cuales confieren una estructura temporal coherente a la fisiología del organismo. Con el envejecimiento, sin embargo, tales ritmos se deterioran, lo que conlleva el declive del bienestar fisiológico en el individuo mayor, modificaciones que podrían contribuir a la inmunosenescencia. Por otro lado, en las últimas décadas, son muchas las evidencias acumuladas sobre el papel del estrés oxidativo como uno de los principales agentes etiológicos en numerosas enfermedades, además de encontrarse relacionado con la fragilidad y diversas discapacidades funcionales. Este es el

caso de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cuya patología no sólo cursa con altos grados de inflamación y oxidación en el pulmón, sino también a un nivel sistémico. Así mismo, nuestro grupo de investigación ha demostrado, gracias a la utilización del modelo de ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTgAD), que los individuos con Alzheimer presentan un deterioro progresivo de la funcionalidad de los leucocitos tímicos y esplénicos, así como un aumento de los niveles de estrés oxidativo en esas células periféricas y una menor esperanza de vida media.

Sin embargo, la literatura científica sobre la inmunosenescencia presenta numerosos resultados contradictorios, especialmente en lo referente a la evolución de una misma citoquina al avanzar la edad, aspecto que pone en relevancia el contexto fisiológico donde dicha citoquina es medida. Por ello, es importante confirmar qué parámetros relacionados con el SI, ya sugeridos como marcadores de salud y edad biológica, lo son realmente, así como encontrar nuevos parámetros que puedan servir como tales marcadores. En este contexto, y como confirmación del papel del SI de indicador de longevidad, resulta de gran interés comprobar si los nonagenarios mantienen un estado funcional y de oxidación de sus células inmunitarias en condiciones similares a la de los adultos, al igual que ha sido comprobado en los centenarios. Hay que destacar que son pocos los trabajos que estudian los cambios en el SI con el envejecimiento analizando separadamente a hombres y mujeres, y especialmente en personas longevas. También, son casi inexistentes los estudios que abordan el papel de los ritmos circadianos y circanuales en el contexto de la inmunosenescencia. Por otro lado, el estudio de la funcionalidad y el estado de oxidación de las células inmunitarias de sangre periférica de personas con distintos grados de EPOC podría revelar, además de la existencia de un envejecimiento prematuro, nuevos marcadores del desarrollo de esta enfermedad. De la misma forma, el estudio longitudinal de los leucocitos peritoneales de ratones 3xTgAD podría proveer de indicadores de inicio y progresión de la enfermedad de Alzheimer, así como confirmar la relación de los mismos con la longevidad de los individuos.

Por todo ello, los objetivos planteados en la presente tesis han sido:

**1º objetivo:** Analizar la funcionalidad de células inmunitarias, neutrófilos (N) y linfocitos (L) y el estado de inflamación y oxidación, en muestras de sangre periférica de una población

de hombres y mujeres de edad adulta (30-49 años), adulta-madura (50-59 años) y madura (60-79 años).

**2º objetivo:** Estudiar los efectos de los ritmos circadianos y circanuales sobre diversas funciones inmunitarias de N y L en humanos, así como el impacto del envejecimiento sobre tales efectos.

**3º objetivo:** Caracterizar diversos parámetros de función inmunitaria, de niveles de citoquinas secretadas en diferentes condiciones, y de defensa antioxidante en una población de hombres y mujeres nonagenarios, como posibles marcadores de envejecimiento saludable y longevidad.

**4º objetivo:** Analizar los niveles de antioxidantes totales (TAC) plasmáticos en una amplia población de personas mayores de 65 años con el fin de establecer posibles correlaciones entre la cantidad de TAC y diversas características funcionales y patologías de estos individuos.

**5º objetivo:** Analizar parámetros de función inmunitaria y de defensa antioxidante en un grupo de hombres con EPOC de grado moderado y severo, como posibles marcadores de envejecimiento prematuro y de desarrollo de la enfermedad.

**6º objetivo:** Estudiar de manera longitudinal los cambios en diversos parámetros funcionales y de estrés oxidativo en leucocitos peritoneales de ratones 3xTgAD, así como relacionarlos con la longevidad.

Los **resultados** correspondientes al 1º objetivo muestran un aumento de la adherencia y una disminución de la quimiotaxis de N y L, de la linfoproliferación y de la actividad NK, al avanzar la edad, así como una disminución de los niveles de IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8 en el sobrenadante de células mononucleares estimuladas con PHA, tanto en hombres como en mujeres. Sin embargo, la liberación de las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  en el plasma de sangre periférica procedente de una estimulación previa con LPS aumenta con el envejecimiento, al igual que lo hacen sTNF-RI y -RII. Con la edad también se observan mayores cantidades de PCR, IL-6, sTNF-RI y -RII en plasma. El contenido de GSSG aumenta tanto en los N como en los L, y si bien los primeros presentan un aumento de GSH con el envejecimiento, el cociente GSSG/GSH es mayor en ambos tipos celulares al avanzar la edad. Además, los niveles de 8-isoprostano en plasma aumentan a partir de los 60 años, especialmente en los hombres. En

cuanto al 2º objetivo, los resultados indican variaciones en la funcionalidad del SI analizada a las 10:00h y a las 15:00h en personas jóvenes y septuagenarias, siendo tales cambios diferentes al avanzar la edad. Los valores obtenidos a las 15:00h corresponden a los de sujetos más “envejecidos”, especialmente en personas septuagenarias, mostrando una menor quimiotaxis de L y actividad NK. En lo que respecta a los ritmos circanuales, las personas de 60-79 años, al contrario que las de 30-49 años, presentan un deterioro funcional del SI en invierno, con una menor quimiotaxis de N y L, linfoproliferación y actividad NK. En lo que respecta al 3º objetivo, los resultados obtenidos muestran unas características funcionales del SI de nonagenarios similares a las de los individuos adultos. El género y el tipo de muestra de sangre periférica son factores a tener muy en cuenta a la hora de valorar la evolución de la secreción de las citoquinas con el envejecimiento. Así, en el plasma obtenido de sangre incubada previamente en ausencia/presencia de LPS se observa un aumento de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-2, desde la edad adulta hasta la nonagenaria. Sin embargo, en los sobrenadantes de cultivo de mononucleares estimuladas con PHA presentan unos niveles menores en los septuagenarios, mientras que en los nonagenarios son similares a los de los adultos, especialmente en los hombres. Hay que destacar la elevada liberación de IL-10 por los leucocitos de las mujeres nonagenarias en presencia de LPS. Por su parte, los niveles plasmáticos de esas citoquinas se encuentran disminuidos en los adultos y los nonagenarios en relación a los septuagenarios. Los resultados del 4º objetivo indican unos valores muy elevados de TAC en las personas que padecen de infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca e hipertensión arterial. No obstante, al introducir el factor género, en las dos primeras patologías, son sólo las mujeres las que presentan dicho aumento, mientras que los hipertensos de ambos sexos muestran mayores niveles de TAC. Los resultados correspondientes al 5º objetivo muestran una disminución de la fagocitosis, de la linfoproliferación y de la actividad NK, así como una mayor capacidad de secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 y menor de IL-10, y un menor contenido de glutatión total y mayor de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en los leucocitos de personas con EPOC en comparación con los controles. Algunos de estos cambios dependen de la gravedad de la enfermedad. En cuanto al 6º objetivo, los resultados indican una disminución prematura de la quimiotaxis de macrófagos y L, de la fagocitosis y de la actividad NK en los leucocitos peritoneales de los 3xTgAD en relación a los controles a lo largo de las edades analizadas, así como una disminución de GSH y un aumento de GSSG/GSH en esas células. Algunos parámetros ya se encuentran alterados a los 2 meses de

edad, mientras que otros continúan estándolo a los 15 meses, edad en la que los 3xTgAD comenzaron a morir de manera natural.

Como **conclusión** se podría decir que:

**1.** Con el envejecimiento, los neutrófilos y los linfocitos muestran unas capacidades funcionales deterioradas y una desregulación en la liberación de citoquinas. Todo ello puede contribuir al estado de inflamación de la vejez. A su vez, al avanzar la edad, existe un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes por un aumento de los primeros. Los resultados parecen indicar la validez de la mayoría de los parámetros analizados como marcadores de edad biológica, especialmente en las mujeres.

**2.** La funcionalidad de las células inmunitarias presenta variaciones circadianas y circanuales, que se modifican con el envejecimiento. A las 15:00h y en invierno existe un deterioro en dicha funcionalidad, especialmente en los linfocitos de las personas mayores.

**3.** Los nonagenarios conservan una funcionalidad de las células inmunitarias similar a la de los adultos, lo que acredita a las funciones estudiadas como marcadores de longevidad. La secreción de citoquinas en presencia de PHA por las células mononucleares de los nonagenarios es similar a la de los adultos, especialmente en los hombres. No obstante, las pro-inflamatorias secretadas por el conjunto de las células sanguíneas, en presencia de LPS, es mayor en nonagenarios que en individuos septuagenarios. Los monocitos y especialmente los neutrófilos parecen tener un papel clave en el estado de “inflamm-aging”.

**4.** La capacidad antioxidante total parece un buen indicador de estrés oxidativo en ciertas situaciones fisiológicamente adversas, al menos en las mujeres.

**5.** Los hombres con EPOC presentan un deterioro funcional del SI y un elevado estado de oxidación e inflamación, cambios que tienen lugar de manera dependiente de la gravedad de la enfermedad. Esta desregulación inmunitaria acelerada en las personas con EPOC, sugiere a esta enfermedad como un estado de envejecimiento prematuro.

**6.** Los ratones 3xTgAD muestran un deterioro prematuro de la función inmunitaria y de parámetros de estrés oxidativo, alteraciones que pueden ser responsables, al menos en parte, de su menor esperanza de vida. La valoración del SI y el estrés oxidativo a nivel periférico, se propone como marcador para la detección del estadio preclínico y prodrómico, y de la progresión de la enfermedad de Alzheimer.



*Abstract*





## **CHARACTERIZATION OF IMMUNOLOGICAL AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN HUMAN AGING AND IN A MOUSE MODEL OF ALZHEIMER DISEASE**

Aging is a universal, progressive, intrinsic and deleterious process, which is characterized by its great heterogeneity, since there are different rates of physiological changes in the various systems of the organism and in the diverse members of a population of the same chronological age. All physiological systems are affected by aging and especially the homeostatic systems such as nervous, endocrine and immune systems. The age-related alterations in the immune system, a process known as immunosenescence involve changes in leukocyte populations and function, encompassing both innate and adaptative immunity, as well as the cytokine network, leading to a decrease in the resistance to infections and an increase in autoimmune processes and cancer. In addition, in agreement with the free radical theory proposed by Harman in 1956 to explain how the aging process occurs, the immune cells show oxidative stress due to increased oxidants and/or decreased antioxidant defenses, which could explain the age-associated functional capacity deterioration of these cells. Our research group has demonstrated that the immune system could reflect and change the rate at which aging take place, and therefore the biological age of the individual. Thus, several immune cell function parameters have been proposed not only as indicators of health and longevity, but also as a tool for measuring the biological age. In fact, we have observed that centenarian leukocytes preserve functional capacities and redox homeostasis at levels similar to those of adult subjects, aspects that could be responsible for reaching high longevity. There are other factors that may modify the immune system, such as circadian and circannual rhythms, which promote coherent physiological responses in the whole organism. With aging, both rhythms deteriorate, leading to an impairment of physiological well-being in elderly people. Moreover, there is much evidence on the role of oxidative stress as a major etiological agent in numerous diseases, besides being related to frailty and various functional disabilities. This is the case of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), whose pathology not only presents high degrees of oxidation and inflammation in the lung, but also in the systemic circulation. In the same way, using the triple transgenic mouse model for Alzheimer's disease (3xTgAD), we have shown progressive deterioration of thymic and splenic leukocyte functions and increased levels of oxidative stress in these peripheral cells of 3xTgAD mice, as well as a shorter life span.

However, studies on immunosenescence have shown numerous contradictory results, especially with regard to the evolution of cytokines with advancing age, since the physiological context in which each cytokine is measured, is very relevant. It is important to ascertain which of those immune parameters, previously suggested as markers of health and biological age, actually meet these features, and to find new parameters that could serve as such markers. In this context, and as a way of confirmation of the role of the immune system as an indicator of longevity, is of great interest to check if nonagenarian immune cells maintain functional capacities and oxidative stress states similar to that of adults, as has been shown in centenarians. It is noteworthy that few studies examine the changes of the immune system with aging, analyzing men and women separately, especially in subjects reaching a very advanced age. Also, there are almost no studies addressing the role of circadian and circannual rhythms in the context of immunosenescence. Moreover, the study of the function and oxidative state of peripheral blood immune cells of people with different degrees of COPD could reveal, besides the existence of a premature aging, new markers of disease development. Likewise, the longitudinal study of peritoneal leukocytes of 3xTgAD mice could provide prodromic and progression indicators of Alzheimer's disease, and confirm the relationship of these with the longevity of individuals.

Therefore, the objectives of the present thesis were:

**1<sup>st</sup> objective:** To analyze the functional capacity of immune cells, neutrophils and lymphocytes, as well as the inflammation and oxidation states in peripheral blood samples of a population formed by men and women of three age groups, adult (30-49 years), adult-mature (50-59 years) and mature (60-79 years).

**2<sup>nd</sup> objective:** To study the effects of circadian and circannual rhythms on various immune functions of human neutrophils and lymphocytes, and the impact of aging on those effects.

**3<sup>rd</sup> objective:** To characterize various immune function parameters, the secretion of cytokines in different conditions, as well as parameters of antioxidant defense in a nonagenarian population formed by men and women, as potential markers of healthy aging and longevity.

**4<sup>th</sup> objective:** To analyze the plasmatic levels of total antioxidant capacity (TAC) in a large population of people over 65 years of age to establish possible correlations between the amount of TAC and various functional characteristics and pathologies of these subjects.

**5<sup>th</sup> objective:** To analyze immune function and antioxidant defense parameters in a group of men with moderate and severe COPD, as possible markers of both premature aging and disease development.

**6<sup>th</sup> objective:** To study, longitudinally, the changes of function and oxidative stress parameters in peritoneal leukocytes of 3xTgAD mice, as well as to relate them with longevity.

Regarding the 1<sup>st</sup> objective, the **results** showed an increase of adherence and a decrease of chemotaxis, in both neutrophils and lymphocytes, lymphoproliferation, and NK activity with aging, as well as a lower liberation of IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-8 in PHA-stimulated peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) supernatants, in both men and women. Nevertheless, the secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated peripheral blood plasma was increased with advancing age, as well as sTNF-RI and -RII. With age, increased amounts of CRP, IL-6, sTNF-RI and -RII were also observed in plasma. The GSSG content increases in both neutrophils and lymphocytes, and although the former exhibited an increase of GSH levels with aging, the GSSG/GSH ratio was higher in both cell types with advancing age. In addition, plasmatic levels of 8-isoprostane increased in mature people, especially in men.

As for the 2<sup>nd</sup> objective, the results indicated different values of immune cell function at 10:00 and 15:00 in both young and septuagenarian people, such changes being modified with advancing age. The values obtained at 15:00 correspond to more *aged* subjects, especially people in their seventies, showing a higher adhesion capacity of lymphocytes and a lower chemotaxis and NK activity of PBMCs. Regarding circannual rhythms, people of 60-79 years old, in contrast to those of 30-49 years old, exhibited an impairment of immune cell functions in winter, with lower values of neutrophils and lymphocytes chemotaxis, lymphoproliferation, and NK activity in this season.

With regard to the 3<sup>rd</sup> objective, the results obtained in nonagenarians showed similar immune cell function capacities to those of adults. *Gender* and *type of peripheral blood sample* are factors to take into account when assessing the evolution of the secretion of

cytokines with aging. Thus, levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-2 were increased in non- and LPS-stimulated peripheral blood plasma from adulthood to nonagenarian. However, whereas these cytokines in PHA-stimulated PBMCs supernatants were diminished in septuagenarians, nonagenarians exhibited similar values to those of adults, especially in men. The high LPS-related secretion of IL-10 by leukocytes of nonagenarian women is noteworthy. In addition, plasma levels of these cytokines were decreased in adults and nonagenarians in relation to people of seventy years of age.

The results of the 4<sup>th</sup> objective indicate increased values of TAC in people suffering from myocardial infarction, heart failure and hypertension. However, taking into account the gender factor, only women presented that increase in the former two pathologies, while hypertensive men and women showed higher levels of TAC.

Regarding the 5<sup>th</sup> objective, the results showed decreased phagocytosis, lymphoproliferation and NK activity, and a higher secretion capacity of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8, and a lower one of IL-10, as well as lessened total glutathione and increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> content in peripheral blood leukocytes of men with COPD compared to healthy controls. Some of these changes depend on the severity of the disease.

As for the 6<sup>th</sup> objective, the results indicated a premature decrease in macrophage and lymphocyte chemotaxis, phagocytosis, and NK activity in peritoneal leukocytes of 3xTgAD in comparison to non-transgenic control mice, throughout the ages analyzed, as well as a lower GSH content and higher GSSG/GSH ratio in these cells. Some parameters were already altered at the age of 2 months, and others remained changed at 15 months, the age at which 3xTgAD begin to die naturally.

#### **In conclusion:**

1. With aging, neutrophils and lymphocytes show functional capability impairments and a deregulation in the release of cytokines. These facts may contribute to the inflammatory state in the elderly. In turn, with advancing age, there is an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the former. The results suggest the validity of most of the parameters analyzed as markers of biological age, especially in women.

**2.** The function of immune cells exhibit circadian and circannual variations, which change with aging. At 15:00 and in winter there is deterioration in such functionality, especially in lymphocytes of older people.

**3.** Nonagenarians preserve similar function capabilities of immune cells to those of adults, which supports the parameters studied as markers of longevity. Nonagenarian PHA-stimulated PBMC cytokine secretion is similar to that of adults, especially in men. However, nonagenarian LPS-stimulated pro-inflammatory cytokine secretion by all blood cells is higher than in people of seventy years of age. Monocytes and particularly neutrophils seem to be closely involved in the state of “inflamm-aging”.

**4.** The total antioxidant capacity seems a good indicator of oxidative stress in certain physiologically adverse situations, at least in women.

**5.** The men with COPD exhibit a functional deterioration of immune cells and a high oxidation and inflammation states, changes that depend on the severity of the disease. This accelerated immune deregulation suggests premature aging in people with COPD.

**6.** The 3xTgAD mice show premature deterioration of immune functions and oxidative stress parameters, alterations that may be responsible, at least in part, for their lower life expectancy. Immune function and oxidative stress parameters, at the peripheral level, are proposed as markers of preclinical, prodromic and progression stages of Alzheimer’s disease.



# Introducción





## 1.1. EL ENVEJECIMIENTO

### 1.1.1. Definición y características del envejecimiento

En las últimas décadas, el interés por el estudio del envejecimiento ha aumentado de manera espectacular, no sólo porque las personas mayores constituyan un colectivo cada vez más numeroso de la población, sino también debido a la necesidad de conocer los mecanismos que nos hacen envejecer, con el fin de mantener una buena calidad de vida a lo largo de las edades más avanzadas. Según la última edición del informe *Panorama de la Salud 2013* de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), la esperanza de vida media en España se sitúa en 82,4 años, la segunda más alta de la Unión Europea tras Italia (82,7). Esta longevidad media representa la media de años de vida de una determinada población que ha nacido en la misma fecha, y se calcula que en España ha aumentado unos 10 años desde 1970. Además, por sexos, las mujeres poseen una mayor esperanza de vida media, siendo actualmente de 85,4 años, frente a los 79,4 de los hombres. El aumento del porcentaje de personas mayores, junto con la disminución de la tasa de natalidad y la reducción de la mortalidad infantil, ha supuesto un envejecimiento acelerado de la población, debido en gran parte a la mejora sanitaria y social, característica de los países “desarrollados”.

El envejecimiento puede ser definido como el deterioro progresivo y generalizado de las funciones del organismo, que conduce a un estado de menor adaptación a los cambios y una disminuida capacidad para restaurar la homeostasis (De la Fuente y Miquel, 2009). Un claro ejemplo de esto es la incapacidad por parte de las personas mayores de afrontar temperaturas extremas, infecciones, y en general, situaciones de estrés. Así, mientras que los individuos adultos sanos consiguen un balance funcional del organismo a todos los niveles de organización (molecular, celular, tisular y de función global), al envejecer esto resulta más difícil y la homeostasis se deteriora. La acumulación de cambios adversos que tiene lugar al avanzar la edad hace que, aunque el envejecimiento no debe considerarse una enfermedad en sí mismo, se aumente el riesgo a padecerlas, finalmente resultando en la muerte del individuo.

En 1977, Strehler definió el proceso del envejecimiento como: a) *universal*, ya que tiene lugar en todas las especies animales, incluyendo metazoos con reproducción sexual, b)

*progresivo*, debido a que la velocidad a la que se envejece tras la edad adulta es similar a lo largo de la vida, c) *intrínseco*, pues las causas del proceso tienen un origen endógeno, y, d) *deletéreo*, ya que tiene un carácter perjudicial para el individuo.

Además, una de las características principales del proceso del envejecimiento es su gran heterogeneidad. Esto se debe a que no todos los cambios fisiológicos de los diversos sistemas de un organismo cambian al avanzar la edad a la misma velocidad, ni tampoco lo hacen los distintos individuos con una misma edad cronológica. Esto justifica la introducción del concepto “edad biológica”, que determina el grado de envejecimiento de cada individuo, y por lo tanto, su esperanza de vida. La edad biológica y la esperanza de vida media o longevidad media, definido anteriormente, están íntimamente relacionados: los sujetos de una población con un alto grado de envejecimiento, mostrarán una mayor edad biológica y, por tanto, un tiempo menor de vida.

El proceso del envejecimiento concluye al final de la esperanza de vida máxima o longevidad máxima, que se define como el tiempo máximo que vive un individuo que pertenece a una especie determinada. Como ejemplos, en el ser humano, la persona más longeva ha sido la francesa Jeanne Louise Calment que vivió 122 años (el hombre que más tiempo ha vivido es un japonés de 116 años), mientras que en los ratones esa esperanza de vida máxima es de unos 3 años. Así, mientras que la longevidad máxima es un valor fijo para cada especie, no lo es la longevidad media. Ésta puede variar en función del estilo de vida y de los factores ambientales, los cuales se estima que influyen en un 75% sobre el estado de salud de un individuo, haciéndolo los genes en un 25% (Kirkwood, 2008). Por lo tanto, el grado de envejecimiento será el resultado de mecanismos epigenéticos que actúan sobre los genes, desde el estadio fetal y a lo largo de toda la vida de un individuo. En el caso del ser humano es el proceso de envejecimiento el que actualmente constituye el periodo más largo de su vida.

### **1.1.2. ¿Cómo, dónde y por qué envejecemos?. Una teoría integradora del envejecimiento**

Dada la gran complejidad de los cambios que tienen lugar con el envejecimiento, existen más de 300 teorías que explican este proceso (Medvedev, 1990). Sin embargo, muchas de ellas se basan en las consecuencias producidas por éste, y no abordan sus causas. Además,

una buena teoría debería poder ser aplicable a todos los distintos niveles de organización biológica (molecular, celular y fisiológica) de un organismo en su totalidad.

Una de las clasificaciones más claras de las teorías del envejecimiento, es aquella que las agrupa en dos grandes apartados: Por un lado, las “Teorías deterministas”, y por otro, las “Teorías estocásticas” o “epigenéticas”.

Las teorías deterministas proponen que el envejecimiento es el resultado de un proceso genéticamente programado, donde los organismos poseerían genes específicos de longevidad. En este grupo cabe destacar la teoría de Hayflick (1965), según la cual las células tendrían un “reloj endógeno” que marcaría el número de divisiones que son capaces de tener, proponiendo que la pérdida de capacidad mitótica equivaldría a envejecimiento celular. Otra teoría muy conocida sería la del acortamiento de los telómeros (Olovnikov, 1973; Harley *et al.*, 1990), según la cual el acortamiento en cada división celular de los extremos de los cromosomas estaría relacionado con la tasa de envejecimiento, ya que el fin de la división celular se produciría cuando se llegara al acortamiento total de los mismos. Sin embargo, estas teorías describen la senescencia celular replicativa, consecuencia del proceso del envejecimiento, y no su base, puesto que no explicarían la senescencia que tiene lugar en las células postmitóticas, de escasa o nula proliferación, como la mayoría de las neuronas (Goyns, 2002). Además, a pesar de que recientemente se ha descrito una relación entre el tamaño del telómero y la longevidad, ésta podría ser explicada por los niveles de estrés oxidativo encontrados (Atzmon *et al.*, 2010). De hecho, en 2007, Hayflick se retractó de su teoría, afirmando que el envejecimiento es un proceso estocástico donde la acumulación de alteraciones moleculares tendría lugar sistemáticamente tras la maduración reproductiva de los animales (Hayflick, 2007). Así, en la actualidad no existen evidencias directas de la existencia de genes específicos para el envejecimiento, los denominados gerontogenes, a pesar de que sí podrían tener, indirectamente, una influencia sobre la longevidad (Rattan, 1995).

Las teorías estocásticas o epigenéticas señalan que el envejecimiento es el resultado de procesos debidos al azar. Entre ellas, cabe destacar la **“teoría de la oxidación o de los radicales libres”**, propuesta por Harman (1956), actualmente la más aceptada entre los gerontólogos. Esta teoría que, posteriormente, ha sido perfilada por otros investigadores (Miquel *et al.*, 1980; Miquel, 1998; Pamplona y Barja, 2003; Barja, 2004), propone que el

envejecimiento es la consecuencia de la acumulación de daño oxidativo en las biomoléculas, causado por la hiperreactividad de los radicales libres que se producen en nuestras células como resultado de la inevitable utilización del oxígeno. Los radicales libres reaccionan con todo tipo de biomoléculas, como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, al intentar aparear el electrón que tienen desaparecido, tomándolo de esas moléculas que se encuentran cercanas (Fig. 1). Este hecho supone la alteración de dichas moléculas y, consecuentemente, la pérdida de su funcionalidad, y por ende de la función celular.

Dado que el oxígeno es imprescindible en la respiración que permite el mantenimiento de los procesos metabólicos, la mitocondria, y más específicamente su ADN, constituiría la primera diana de esta oxidación, especialmente en las células postmitóticas que poseen una escasa capacidad de regenerar sus organelas. Esto dio paso a lo que se conoce como la **“teoría mitocondrial del envejecimiento”**, que resultó de perfilar la teoría inicial de Harman (Harman, 1972; Miquel *et al.*, 1980; Miquel, 1998; Barja, 2002).

Para comprender por qué envejecemos, otro grupo de teorías, las llamadas evolutivas, explicarían esta pregunta. En ellas, se considera que el envejecimiento es un proceso necesario con el fin de evitar la competitividad entre los organismos y su progenie por la comida y el espacio (Weissman, 1891). El argumento principal es que, aunque fuera posible una supervivencia indefinida, las condiciones de la tierra serían demasiado hostiles para escapar de la muerte. Las especies habrían desarrollado estrategias para dedicar sus recursos fisiológicos a la reproducción y el mantenimiento del soma, aunque la certeza de la muerte conferiría a lo primero una mayor inversión, en pro de la especie (Weissman, 1891). Otra teoría sugiere que el envejecimiento es la consecuencia de la programación de unos genes que proveerían al organismo de un vigor máximo durante su edad reproductora (adulto), pero que después, esos mismos genes poseerían efectos perjudiciales para el individuo (Williams, 1957), el cual como tal “sobraría” en favoreciendo el mantenimiento de la especie.

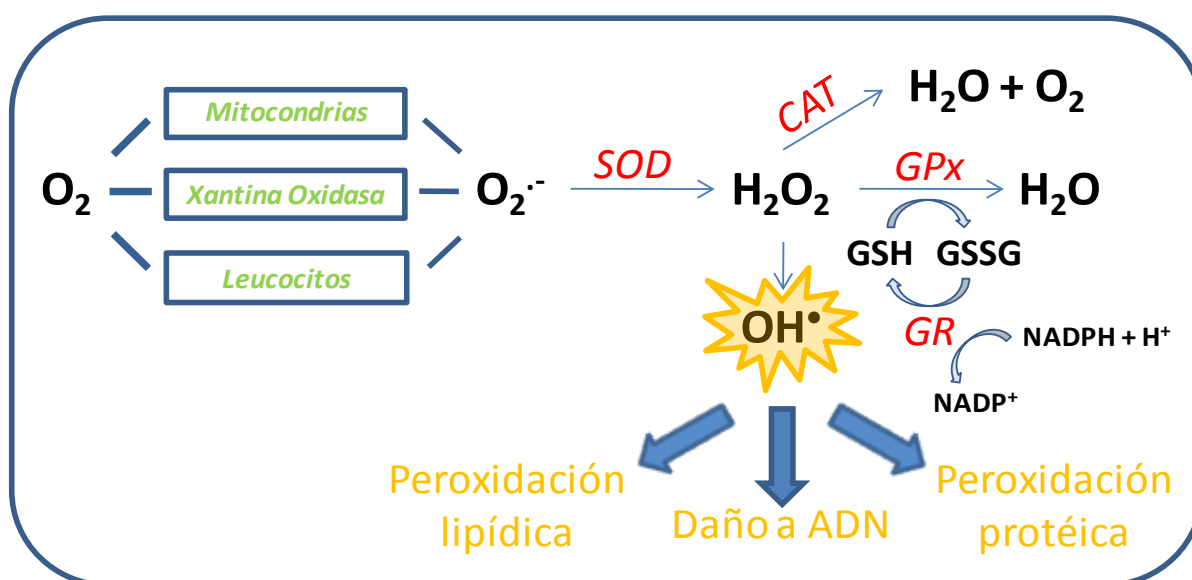
Todo lo mencionado hasta el momento hace destacar que, debido a la complejidad del proceso del envejecimiento, una teoría basada en un único mecanismo no es capaz de ofrecer una explicación satisfactoria para todos los aspectos que caracterizan al mismo. Esto justifica la necesidad de una **teoría integradora** que incluye conceptos del pasado que han dado lugar a explicaciones parciales acerca de los mecanismos que subyacen al

envejecimiento, y otros más actuales, con el fin de aunar las tres preguntas más importantes de la biogerontología: ¿cómo, dónde y por qué envejecemos? (De la Fuente y Miquel, 2009).

En relación al *cómo* ocurre el envejecimiento, se ha propuesto que el envejecimiento se encuentra estrechamente ligado a la oxidación que se produce en condiciones de estrés oxidativo, esto es, aumento de oxidantes o especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y disminución de defensas antioxidantes. Este estrés es la base de muchos cambios asociados a la edad que afectan a la morfología, la fisiología y al comportamiento, en todos los niveles de organización biológica: molecular, celular, tisular, orgánico, y del individuo en general. Además, dada la estrecha relación entre la oxidación y la inflamación descrita en los últimos años (Sarkar y Fisher, 2006; Salminen *et al.*, 2008; Cannizzo *et al.*, 2011), observando un aumento de compuestos pro-inflamatorios con el envejecimiento que conduciría a un estrés inflamatorio, se ha propuesto el término **“oxi-inflamm-aging”** como causa de la pérdida de la funcionalidad que aparece con la senescencia (De la Fuente y Miquel, 2009). Llegados a este punto, es conveniente aclarar que el oxígeno es esencial para la vida, y que ciertas cantidades de ROS son necesarios para muchos procesos fisiológicos que son vitales. Así, los efectos beneficiosos de las ROS tienen lugar a concentraciones bajas/moderadas y son esenciales para las respuestas celulares al daño, como por ejemplo, la defensa contra agentes infecciosos, la función de diversas vías de señalización celular y la inducción de la respuesta mitogénica. Además, irónicamente, varias acciones mediadas por ROS protegen a las células contra el estrés oxidativo inducido por dichas especies reactivas de oxígeno, restableciendo o manteniendo así el *balance redox*, también llamado la *homeostasis redox* (Valko *et al.*, 2007). Por otro lado, las células han generado toda una serie de mecanismos antioxidantes que la protegen contra esa toxicidad del oxígeno, previniendo la formación de ROS y neutralizándolas tras su formación (Fig. 1) (Matés *et al.*, 1999; Knight, 2000; Yoon *et al.*, 2002). Por lo tanto, las funciones de nuestro organismo se basan en un perfecto equilibrio entre los niveles de ROS y de antioxidantes. Es la pérdida de este equilibrio lo que conduce al estrés oxidativo, dando lugar al daño celular, las enfermedades y el envejecimiento (Sies, 1986; Sastre *et al.*, 2000; Valko *et al.*, 2007; Cannizzo *et al.*, 2011).

En cuanto al *dónde* tiene lugar el proceso del envejecimiento, éste comenzaría en las mitocondrias de las células diferenciadas (Miquel *et al.*, 1980).

Para responder el *porqué*, sería necesario considerar varios conceptos propuestos hace muchos años, como que el envejecimiento es la consecuencia de caracteres seleccionados por la evolución que serían ventajosos para los individuos jóvenes de una especie, permitiéndoles alcanzar la edad reproductora en las mejores condiciones y así preservar la especie. Estos mismos caracteres serían desventajosos para los individuos viejos, ya que no serían necesarios para el mantenimiento de la especie. Un ejemplo de este hecho sería la expresión de genotipos pro-oxidantes y pro-inflamatorios, lo que permitiría a nuestros ancestros llegar a la edad reproductora con mayores probabilidades de sobrevivir a infecciones, pero serían deletéreos en edades avanzadas (Franceschi *et al.*, 2000b; De Martinis *et al.*, 2005). Así, tras la edad adulta, las consecuencias que tendrían lugar es lo que se ha denominado “oxi-inflamm-aging” (De la Fuente y Miquel, 2009).



**Figura 1. Vía de formación de radicales libres de oxígeno y especies reactivas de oxígeno (ROS).** Según la teoría de la oxidación o de los radicales libres, el envejecimiento es la consecuencia de la acumulación de daño oxidativo a biomoléculas causado por la alta reactividad de los radicales libres producidos principalmente por las mitocondrias, como resultado del uso necesario del oxígeno. Los leucocitos, mediante escapes del estallido oxidativo, y la xantina oxidasa, pueden también conducir al aumento de ROS. El primer radical libre que aparece en las células es el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) que se transforma en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (una ROS) y radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), el radical libre más reactivo, que lleva a cabo la oxidación de biomoléculas. Las células han desarrollado una amplia variedad de mecanismos antioxidantes para defenderse de esos oxidantes (radicales libres y ROS), como son la enzima superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la transformación de  $O_2^{\cdot -}$  a  $H_2O_2$ , y la catalasa (CAT), que transforma a este último en agua y oxígeno. Además, el glutatión reducido (GSH) es el antioxidante no enzimático más importante que presenta el organismo para eliminar  $H_2O_2$  y peróxidos orgánicos a través de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), que lo transforma en su forma oxidada (GSSG). La enzima glutatión reductasa (GR) devuelve al glutatión a su forma reducida.

### 1.1.3. El concepto de “edad biológica”

Como ya se ha comentado anteriormente, el envejecimiento es un proceso muy heterogéneo, donde los diferentes componentes de un individuo envejecen a diferente velocidad, al igual que cada uno de los miembros de una especie que ha nacido en la misma fecha cronológica. Así, el “tiempo biológico” que se manifiesta en los organismos no tiene por qué coincidir con el “tiempo cronológico” que es determinado por el calendario. Por lo tanto, la edad biológica sería un buen indicativo del estado funcional y el grado de envejecimiento de cada sujeto, y consecuentemente, de su esperanza de vida.

Si conocer la edad cronológica de un individuo es fácil, no lo es la determinación de la edad biológica en términos numéricos. Para ello sería necesario el conocimiento de una serie de parámetros o biomarcadores –bioquímicos, fisiológicos y/o psicológicos- que cambiaran con la edad y que pudieran ser sometidos a análisis estadísticos para poner de manifiesto las relaciones entre edad biológica, edad cronológica, pérdida de salud y expectativas de longevidad.

Con este fin, una de las investigaciones de referencia llevada a cabo al respecto, fue realizada en más de mil varones mediante un estudio longitudinal (Borkan y Norris, 1980). El análisis retrospectivo de este estudio reveló que las personas que presentaban algunos parámetros “más envejecidos” que los mostrados por la mayoría de individuos de su misma edad cronológica, poseían una menor esperanza de vida. Estos biomarcadores incluían parámetros relacionados con la función respiratoria, la tensión arterial y el tiempo de reacción en pruebas psicológicas. Aunque ya desde 1970, el envejecimiento biológico ha sido objeto de estudio (Furukawa *et al.*, 1975; Mitnitski *et al.*, 2002; Ueno *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2010), en la actualidad no se ha llegado a un consenso claro de los parámetros adecuados para la valoración de la edad biológica. Además, los trabajos al respecto no han incluido parámetros inmunitarios, que en la actualidad se estiman esenciales y altamente representativos de la verdadera edad biológica de un individuo. Así, son muchos los estudios que han demostrado una correlación positiva entre la adecuada funcionalidad de las células inmunitarias y la longevidad (Ferguson *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1997; Ogata *et al.*, 1997; Guayerbas *et al.*, 2002a; 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; De la Fuente *et al.*, 2005; De la Fuente, 2008; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; De la Fuente y Miquel, 2009; Arranz *et al.*, 2010a; 2010b; 2010c; De la Fuente *et al.*, 2011; De la Fuente, 2014; Mate *et al.*, 2014a).



Por otro lado, cabe destacar que la biología del envejecimiento difiere entre hombres y mujeres, ya que algunos biomarcadores estarían caracterizados por el dimorfismo sexual, debido, principalmente, a las múltiples influencias de las hormonas sexuales (Bae *et al.*, 2008). Estas diferencias relacionadas con el género provocan que un posible marcador de edad biológica para uno de los sexos no tenga por qué ser de la misma forma válido para el otro. Además también podría conferir diferencias en la salud y la longevidad en función del sexo.

#### 1.1.4. Envejecimiento y fragilidad

Son muchos los estudios que han demostrado una relación directa entre la enfermedad y la discapacidad. Sin embargo, no existe una explicación clara para la discapacidad en ausencia de enfermedad o para la gran variabilidad del envejecimiento. Así, la “fragilidad” es un concepto emergente que está cobrando una gran importancia en los últimos años.

El fenotipo *frágil* fue definido por Linda Fried y colaboradores en el año 2001, y se identifica, clínicamente, con el cumplimiento de tres o más de los siguientes criterios: pérdida involuntaria de peso en el último año (>4 Kg), estado de ánimo decaído, debilidad (medida por pérdida de la fuerza de agarre), velocidad de marcha lenta y baja actividad física. La persona frágil es altamente vulnerable a estresores, debido a una alteración en múltiples sistemas y en sus interrelaciones, lo que conduce a una disminución de la reserva homeostática y de la capacidad de adaptación del organismo, y lo predispone a eventos adversos de salud (Bergman *et al.*, 2007).

Justamente antes de la detección de la fragilidad, hay un período de tiempo en el que los individuos se definen como *pre-frágiles* ya que muestran algunas de las características arriba mencionadas, y una alta probabilidad de desarrollar el síndrome completo en un corto periodo de plazo. Así, uno de los desafíos actuales más relevantes de la investigación del envejecimiento se centra en esta etapa, donde se hace muy necesaria la búsqueda y validación de marcadores que permitan la detección temprana de la fragilidad, cuando la intervención preventiva puede ser mucho más eficiente.

Si bien el envejecimiento y la fragilidad están estrechamente relacionados, no necesariamente se solapan. Mientras que algunas personas mayores disfrutan de un

excelente nivel de capacidad funcional, rendimiento biológico e independencia social, definidos como *no-frágiles*, un número bastante significativo sufren un perfil totalmente distinto, con una disminución significativa en los aspectos señalados. Por lo tanto, el perfil de fragilidad está sujeto a la acumulación de déficit, y la carga de más o menos déficit determinará el tiempo restante hasta la muerte del sujeto, actuando así como un estimador de edad biológica (García-García *et al.*, 2011). De hecho, gracias a estudios longitudinales se ha demostrado que la fragilidad es un factor de riesgo para la mortalidad, además de la discapacidad y la hospitalización (Fried *et al.*, 2001; Cawthon *et al.*, 2007; Avila-Funes *et al.*, 2008; Ensrud *et al.*, 2009).

La etiología de la fragilidad no está clara, ya que la gran mayoría de los datos se obtienen cuando el deterioro que conduce a la fragilidad se encuentra ya establecido, y por lo tanto, la situación ofrece un espacio limitado para la mejora. Además, son muy diversos los factores que se han relacionado como causa de la fragilidad. Entre ellos, se destacan los factores socioeconómicos, la pobreza, el nivel educativo o el entorno social y familiar (Rochat *et al.*, 2010). También, el estilo de vida se encuentra íntimamente relacionado con la fragilidad, pudiéndose destacar la inadecuada nutrición y el nivel de ejercicio físico (Ensrud *et al.*, 2010; De Gonzalo-Calvo *et al.*, 2012). Además, se sabe que un gran número de patologías crónicas subyacen a la fragilidad, donde se incluiría la sarcopenia (Cooper *et al.*, 2012), la osteoporosis (van den Bergh *et al.*, 2012), las alteraciones osteo-articulares (Lalmohamed *et al.*, 2012), las enfermedades cardiovasculares (Boxer *et al.*, 2010), la insuficiencia respiratoria crónica (Vaz Fragoso *et al.*, 2012), el deterioro neurológico (Van Rensbergen y Nawrot, 2010) o los factores endocrinos y metabólicos (Hyde *et al.*, 2010) entre otros.

Los estudios epidemiológicos, y concretamente los estudios de cohortes, son los diseños mejores para analizar un grupo de individuos con características comunes (Mann, 2003), como es, por ejemplo, la edad avanzada. La información obtenida es detallada y puede ser evaluada en términos de influencia y capacidad de predicción del problema objeto de estudio, pudiendo ser múltiples las variables que pueden ser identificadas como predictores. Así, el estudio Toledo para un Envejecimiento Saludable (ETES) surgió con el objetivo de evaluar, además de la prevalencia del síndrome de fragilidad en la población mayor de España y su impacto en el sistema de salud, los mecanismos subyacentes, los factores de

riesgo, su relevancia clínica y funcional, así como buscar posibles nuevos marcadores del fenotipo del individuo frágil.

La base de datos creada por dicho estudio, reúne toda una batería de variables que permiten establecer posibles relaciones entre ellas, como son **1)** la *edad*, **2)** el *sexo*, **3)** la *fragilidad* (criterio de Fried; Fried *et al.*, 2001), **4)** *actividades básicas* (índice de Katz; Katz *et al.*, 1963) e *instrumentales de la vida diaria* (índice de Lawton; Lawton y Brody, 1969), **5)** *depresión* (Escala Geriátrica de Depresión, GDS; Yesavage, 1988), **6)** *cognición* (Mini-Mental State Examination, MMSE; Folstein *et al.*, 1975), **7)** *índice de masa corporal*, IMC (IMC = peso / (talla)<sup>2</sup> en kg/m<sup>2</sup>), **8)** presencia o no de enfermedades cardiovasculares o aspectos relacionados con ellas, como **8a)** *infarto de miocardio*, **8b)** *insuficiencia cardíaca*, **8c)** *claudicación intermitente*, **8d)** *angina de pecho*, **8e)** *fibrilación auricular*, **8f)** *hipertensión arterial*, **8g)** *diabetes mellitus*, **8h)** *valvulopatía*, **8i)** *trombosis venosa profunda*, **8j)** *embolia pulmonar*, **8k)** *intervención en el corazón o en alguna arteria*, **8l)** *colesterol alto*, **8m)** *accidente cerebrovascular*, y **8n)** *ataque isquémico transitorio* (recuperado en menos de 24 horas).

Dado que como principales mecanismos implicados en el desarrollo de la fragilidad han sido propuestos el estado oxidativo, la respuesta inmunitaria y la inflamación (Walston *et al.*, 2006; Mulero *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011), en los últimos años la investigación básica y clínica están aunando fuerzas con el fin de encontrar nuevos marcadores relacionados con estos aspectos que puedan definir el perfil de fragilidad.

#### **1.1.5. El envejecimiento del sistema inmunitario: La inmunosenescencia**

La función del sistema inmunitario consiste en garantizar la identidad y la integridad del organismo, gracias a su capacidad para identificar con una alta especificidad lo propio de lo extraño. Con la edad, sin embargo, este sistema se modifica y deteriora dando paso a un aumento en la susceptibilidad y severidad a/de infecciones así como en la incidencia de fenómenos autoinmunes y cáncer (Yancik y Ries, 1991; Hirokawa *et al.*, 1992). De hecho, los procesos infecciosos son una de las principales causas de la elevada tasa de morbilidad y mortalidad en personas de edad avanzada, hecho que se atribuye a los cambios que sufren los componentes del sistema inmunitario con la edad, lo que se denomina

inmunosenescencia (Perskin y Cronstein, 1992; Pawelec *et al.*, 1995). La inmunosenescencia, es un proceso que afecta a prácticamente todos los componentes celulares (monocitos/macrófagos, neutrófilos, células natural Killer y linfocitos) así como no celulares (mediadores solubles o citoquinas) del sistema inmunitario innato y adaptativo (Solana *et al.*, 1999; DelaRosa *et al.*, 2006). Lejos de ser un evento unidireccional, el sistema inmunitario experimenta una remodelación o reestructuración con la edad, donde algunas funciones se reducen, otras aumentan, o se mantienen sin cambios (Sansoni *et al.*, 2008; De la Fuente y Miquel, 2009). Además, es un proceso en continuo desarrollo que incluye complejas reorganizaciones y mecanismos compensatorios (Globerson y Effros, 2000). Así, la inmunosenescencia puede ser considerada como la prueba de que los efectos beneficiosos del sistema inmunitario en su labor para neutralizar los agentes nocivos en edades tempranas de la vida, se vuelven perjudiciales en la vejez, etapa de la vida que constituye un plazo no previsto por la evolución (De Martinis *et al.*, 2005).

#### **1.1.5.1. Cambios en las poblaciones leucocitarias con la edad**

Las variaciones en la composición de las poblaciones leucocitarias asociadas a la edad son parte de la remodelación que ocurre en las células del sistema inmunitario, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa, y es uno de los aspectos mejor estudiados dentro de la inmunosenescencia.

Todas las células del sistema inmunitario provienen de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea, que proliferan y diferencian dando lugar a las células del linaje mieloide (monocitos y leucocitos granulares, como son los neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y linfoide (linfocitos T, B y NK). El balance equilibrado entre la generación de ambos linajes, característico de individuos jóvenes, se pierde con el envejecimiento, mostrándose una tendencia hacia los progenitores mieloides en detrimento de los linfoides (Linton y Dorshkind, 2004; Shaw *et al.*, 2010). Así, como se irá detallando a continuación, con la edad los componentes del linaje mieloide no sufren, en general, reducciones en su porcentaje y número, lo que no sucede en la fracción linfoide.

Dada la gran complejidad de la expresión de los complejos de diferenciación (CD) de la superficie de las células inmunitarias, lo que incluye, además, el hecho de que muchos

leucocitos comparten un mismo CD y que existe un gran número de marcadores para identificar un mismo tipo celular, utilizar una clase u otra de marcador puede dar lugar a resultados contradictorios. Además, la especie a estudiar y la procedencia de la muestra a caracterizar son aspectos a tener en gran consideración.

Son varios los componentes celulares que conforman el sistema inmunitario innato o inespecífico. Una de las principales células de esta inmunidad son los **neutrófilos**, un tipo de célula fagocítica también denominados polimorfonucleares (PMN), que representan el 60-70% de los leucocitos en sangre (Hellewell y Williams, 1994). Con el envejecimiento, no se han observado cambios en el número de neutrófilos circulantes (Schröder y Rink, 2003), ni tampoco en la expresión de moléculas de adhesión como CD11b (Butcher *et al.*, 2001), también presentes en la superficie de otros fagocitos. Sin embargo, otros autores indican que si bien no hay diferencias en los niveles de expresión de CD11b con el envejecimiento, sí se observa un aumento en su densidad por neutrófilo a edades avanzadas (Walrand *et al.*, 2006).

En cuanto a los **monocitos** (CD14+), pese a que se ha comprobado que al envejecer no varían en cuanto a su número (Ahluwalia *et al.*, 2001), se ha descrito un aumento con la edad del fenotipo CD14<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> en contraste con el que aparece predominante en los jóvenes CD14<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup>. Esto indicaría un mayor estado de activación de los monocitos en personas mayores (Sadeghi *et al.*, 1999; Globerson y Effros, 2000).

Los trabajos sobre la existencia de variaciones en el número de **macrófagos** con la edad son menos numerosos y contradictorios que en otros fagocitos. Wang y colaboradores (1995) observaron un aumento en el número de macrófagos derivados de médula ósea (Mac-1+) en ratones viejos mediante citometría de flujo, mientras que otros investigadores no encontraron ninguna variación en estas células mediante cultivo *in vitro* al comparar ratones adultos y viejos (Herrero *et al.*, 2002). Además, el estudio de su número a lo largo del envejecimiento habría que considerarlo en función del tipo de tejido donde pueden encontrarse, no hallándose actualmente un consenso en cuanto a dicho número para los distintos tejidos (Brubaker *et al.*, 2011). En lo que a macrófagos peritoneales (CD11b+) se refiere, trabajos previos de nuestro grupo de investigación muestran una disminución con la edad, lo que podría atribuirse a una mayor capacidad de adherencia a los tejidos

peritoneales, y consecuentemente, disminuiría el número de macrófagos que se pueden extraer (Puerto *et al.*, 2005; Arranz *et al.*, 2010b).

En cuanto a las **células NK**, habitualmente caracterizadas por CD56, la mayoría de autores han detectado un aumento progresivo en el número de las mismas, con la edad, en sangre periférica humana (Mariani *et al.*, 1996; Camous *et al.*, 2012), especialmente de aquellas con una expresión tenue de este marcador (CD56<sup>dim</sup>) que serían las encargadas de la función citotóxica (Almeida-Oliveira *et al.*, 2011). Sin embargo, en ratones, las NK, caracterizadas por su marcador murino NK1.1, disminuyen en número en el peritoneo al envejecer (Puerto *et al.*, 2005). Además, se ha observado, en individuos viejos, unos menores niveles de expresión de receptores de activación y eliminación de células diana (como células infectadas y transformadas) como son el receptor de citotoxicidad NKp30 y NKp46, este último también denominado CD335 (Almeida-Oliveira *et al.*, 2011; Camous *et al.*, 2012). Cabe destacar que existen otras poblaciones de células NK, como las NKT que coexpresan el receptor antígeno-específico de los linfocitos T (TCR), y que se encuentran aumentadas en número con la edad (Solana y Mariani, 2000).

En cuanto a la inmunidad adaptativa, está ampliamente demostrado que el número de **linfocitos T** (CD3+) disminuye progresivamente con la edad debido a la involución tímica (Huppert *et al.*, 1998; Boyd *et al.*, 2013). Sin embargo, no todas las subpoblaciones de células T experimentan los mismos tipos de cambios al envejecer; los linfocitos T CD4+, o bien no experimentan modificaciones en su número, o disminuyen a edades muy avanzadas, mientras que los linfocitos T CD8+, según la mayoría de los investigadores, aumentan en número (Huppert *et al.*, 1998; Krause *et al.*, 1999; Pawelec, 2012). Así, con el envejecimiento, el cociente CD4/CD8 se invierte (Pawelec, 2012), parámetro que se ha relacionado con un aumento de la tasa de mortalidad a partir de los 60 años de edad (Wikby *et al.*, 2008), aunque la bibliografía también apunta a una ausencia en la alteración de este cociente en otras localizaciones como el bazo (Simioni *et al.*, 2007).

Además, en ambas subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, las células vírgenes o *naïve* (CD45RA+, posteriormente caracterizadas también como CD95-) son las que principalmente van disminuyendo, mientras que aumentan las memoria (CD45RO+) (Fagiolo *et al.*, 1993; Pawelec, 2012). Sin embargo, cabe destacar que esta disminución no ocurre a la misma velocidad, ya que se ha descrito que los mecanismos de control homeostático son

muy efectivos a la hora de mantener una gran diversidad de subtipos de células T CD4+ *naïve* hasta la edad de unos 70 años, donde abruptamente fallan. Contrariamente, el compartimento de células T CD8+ es más inestable, observándose una disminución progresiva de las *naïve* ya durante la edad adulta (Goronzy *et al.*, 2007). Además, con el envejecimiento, tiene lugar una pérdida en la expresión y densidad de CD28 en la superficie de los linfocitos T CD4+ y CD8+, receptor co-estimulador que interacciona con el TCR, induciendo IL-2 y su receptor de alta afinidad CD25, esencial para mantener una adecuada proliferación de estas células (Bryl *et al.*, 2001). Cabe destacar que el estrés antigénico crónico debido a la carga de antígenos a la que nos encontramos sometidos a lo largo del tiempo, característico, especialmente, en las personas durante las últimas décadas de su vida, es responsable del agotamiento progresivo del reservorio de células T *naïve* acompañado de una expansión compensatoria de células T efectoras/citotóxicas CD8+/CD28-, células que se encuentran en fase de senescencia replicativa (Franceschi *et al.*, 2000a).

Por otro lado, en general, y aunque también es objeto de cierta controversia, se ha descrito que los **linfocitos B** disminuyen con la edad debido al declive en su maduración (Huppert *et al.*, 1998; Allman y Miller, 2005). No obstante, el número de células B1 CD5+, que se encuentran preferencialmente en la cavidad peritoneal, aumentan en número y actividad con la edad, lo que contribuiría a mayores niveles de autoanticuerpos (Weksler, 2000).

#### 1.1.5.2. Cambios funcionales en el sistema inmunitario con la edad

La remodelación que experimenta el sistema inmunitario con el envejecimiento se aprecia de forma relevante en la capacidad funcional de sus células. Así, en función del parámetro que se analice, se observarán niveles disminuidos, aumentados o inalterados con la edad.

Antes de comenzar a describir las alteraciones que tienen lugar en la inmunidad innata y adaptativa con el envejecimiento, cabe destacar la gran cantidad de **resultados contradictorios** que se han encontrado en los estudios sobre inmunogerontología, en especial en lo que se refiere a la respuesta innata, dando lugar a discusiones confusas y conclusiones erróneas. Son muchas las fuentes que pueden conducir a esta confusión: La

principal y más evidente es la edad cronológica de los sujetos a estudiar. La gran amplitud y heterogeneidad en los rangos de edad empleados en los distintos estudios sobre envejecimiento, pueden ser la razón de la disparidad de resultados en cuanto a los cambios en ciertas funciones inmunitarias con la edad.

Por otro lado, en 1984, Ligthart y colaboradores propusieron que, los criterios de admisión tales como "aparentemente sanos" o "sin enfermedad manifiesta" no eran suficientes para excluir una posible enfermedad subyacente que pudiera estar influyendo sobre el sistema inmunitario, y por tanto, sobre los resultados. Así, estos investigadores elaboraron una guía de selección de individuos, llamado protocolo SENIEUR (SENIor EUROpean), donde se establecen criterios estrictos de admisión para estudios inmunogerontológicos en humanos, basados en información clínica y datos de laboratorio, además de poner límites para evitar posibles influencias de fármacos. La finalidad de este protocolo es la estandarización de los métodos de inclusión entre los distintos investigadores para estudiar con más detalle la influencia de la edad, como tal, sobre el sistema inmunitario. Sin embargo, se ha comprobado que la mayor parte de la población de edad avanzada no podría ser incluida según el protocolo SENIEUR, dado que sólo se clasificarían el 10-15% de las personas mayores (y el 75% de los jóvenes) como perfectamente sanos y válidos (Pawelec *et al.*, 1998). Así, muchos investigadores proponen no descartar los estudios donde se analiza el deterioro funcional del sistema inmunitario en sujetos no SENIEUR, dado que estos individuos constituyen la mayor parte de la población, con la relevancia clínica que ello implica. Además, dada la existencia de patologías que, si bien se desarrollan durante décadas, no se expresan hasta que la enfermedad está avanzada, no sería posible discernir entre un sujeto "válido" y uno "no válido". Por lo que muchos de los inmunogerontólogos optan por analizar individuos aparentemente sanos, reuniendo información sobre sus enfermedades pasadas y uso de fármacos. Además, el estado psicológico y el nutricional son factores con un impacto significativo sobre la función inmunitaria, aspectos que el protocolo SENIEUR no tiene apenas en cuenta (Pawelec *et al.*, 1995; Krause *et al.*, 1999).

Por otra parte, dada la compleja red de interacciones que se establece entre las células inmunitarias, la presencia de unas u otras en una determinada localización o muestra (sangre completa o células aisladas), así como el estímulo empleado para desencadenar la respuesta inmunitaria (origen, concentración, tiempo de incubación,...), pueden ser



determinantes a la hora de estudiar los cambios asociados a la edad en dicha respuesta. Así, la metodología empleada en términos de *dónde* y *cómo* se mide un determinado parámetro puede conducir a resultados contradictorios a la hora de realizar comparaciones entre los distintos estudios.

Además, la existencia de las influencias circadianas y circanuales sobre el sistema inmunitario, hace de gran consideración la hora del día, así como el momento del año en que se realiza una determinada valoración (Mate *et al.*, 2014b).

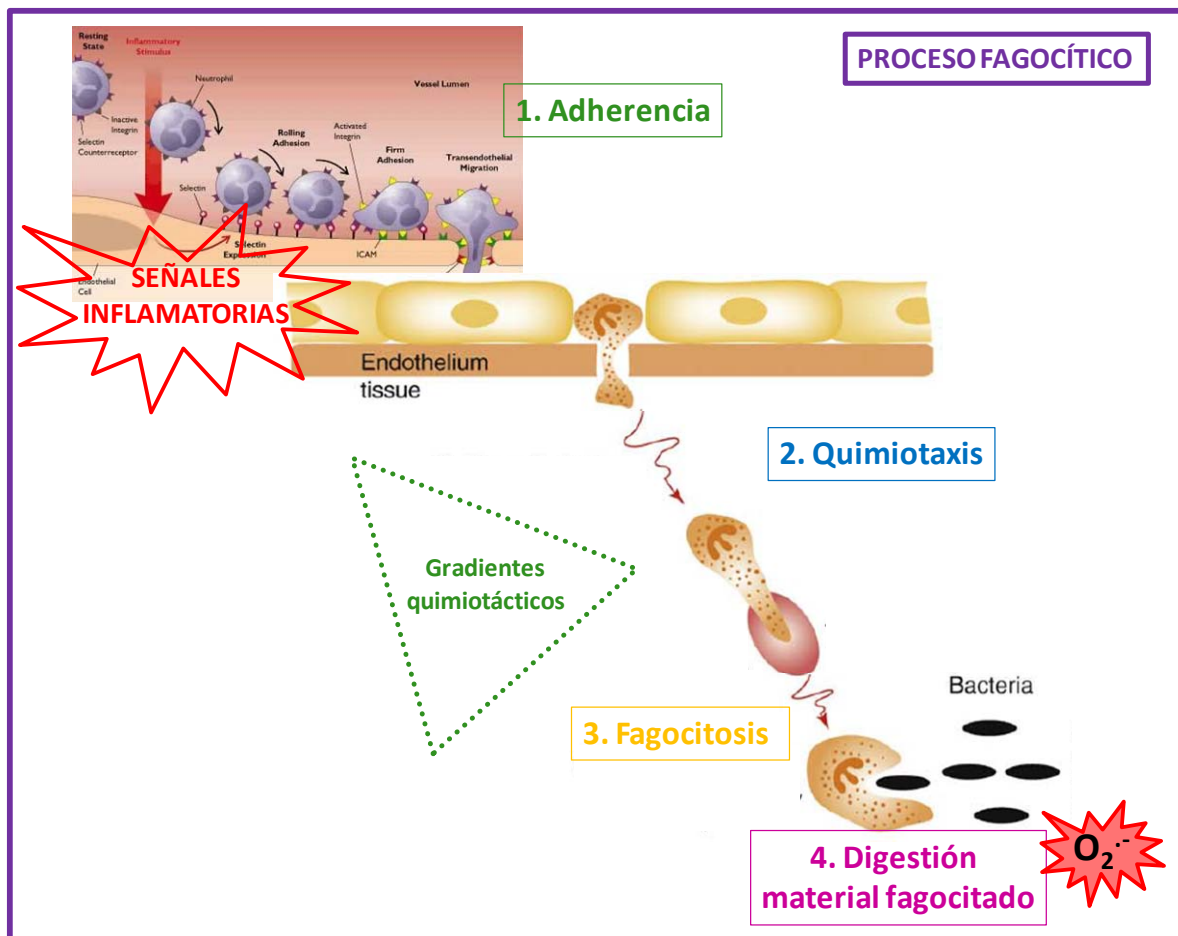
Finalmente, como ya se ha comentado, otros factores como el estado psicológico y nutricional también pueden influir sobre la funcionalidad del sistema inmunitario (Pawelec *et al.*, 1995; Krause *et al.*, 1999).

### ***La inmunidad innata***

El sistema inmunitario innato o la inmunidad inespecífica no sólo confiere una protección directa al organismo frente a agentes extraños, sino que también es esencial para el desarrollo de la inmunidad adaptativa (Pawelec *et al.*, 1998). A pesar de que en el pasado se creía que sus componentes jugaban un papel poco crucial en la disfunción inmunológica que se produce en la vejez, las evidencias científicas acumuladas durante las últimas décadas demuestran un fuerte impacto del envejecimiento sobre este tipo de inmunidad (Hajishengallis, 2010).

Como ya se ha comentado anteriormente, uno de los componentes más importantes de la respuesta innata son los **neutrófilos**, células de vida corta que sobreviven 8-12 horas en la circulación sanguínea antes de experimentar apoptosis, independientemente de que hayan encontrado o no un microorganismo para destruir (Schröder y Rink, 2003). Son las primeras células que llegan al sitio de la agresión y eliminan directamente microorganismos invasores, esto es, bacterias, levaduras y hongos, mediante mecanismos microbicidas. Estos incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), y la liberación de enzimas proteolíticas y péptidos microbicidas presentes en sus gránulos (Shaw *et al.*, 2010). Por lo tanto, su activación y reclutamiento en tejidos periféricos es indispensable para la defensa del hospedador. De hecho, la pérdida progresiva de las funciones de los neutrófilos se considera una causa primaria en el aumento de la morbilidad y mortalidad debido a las infecciones que ocurren durante las últimas décadas de la vida (Tortorella *et al.*, 2001).

Los neutrófilos, junto con otras **células fagocíticas** como los monocitos/macrófagos, llevan a cabo una serie de funciones secuenciales: adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y digestión del material fagocitado, que constituyen lo que se conoce como proceso fagocítico, ilustrado en la Figura 2, mecanismo principal por el cual el sistema inmunitario elimina la mayoría de patógenos extracelulares (Ginaldi *et al.*, 1999).



**Figura 2. Ilustración del proceso fagocítico llevado a cabo por los neutrófilos.** Este proceso engloba la adherencia, la quimiotaxis, la fagocitosis y la digestión del material fagocitado, funciones que se suceden en el tiempo. (Obtenido y modificado de Panda *et al.*, 2009).

En las zonas de inflamación, las señales inflamatorias derivadas de bacterias y producidas por el hospedador son abundantes; estos componentes estimulan a las células endoteliales presentes cerca del sitio de la inflamación. A través de sus receptores de superficie, los neutrófilos circulantes reconocen estas señales de inflamación que se generan como gradiente quimiotáctico, como la exposición de las selectinas en las células endoteliales, al ir rodando (del inglés, *rolling*) sobre dichas células, hasta realizar una

adhesión firme al endotelio mediada por integrinas. Seguidamente, los neutrófilos extravasan la barrera endotelial y migran a lo largo de los gradientes quimiotácticos (quimiotaxis), hasta llegar al sitio de la inflamación donde ingerirán el patógeno (fagocitosis) y lo eliminarán mediante la producción de ROS, siendo el anión superóxido el primer radical libre que generan (Panda *et al.*, 2009; Dalboni *et al.*, 2013).

Con el envejecimiento, sin embargo, se han descrito toda una serie de alteraciones asociadas a este proceso:

En la capacidad de **adherencia** de los neutrófilos, primera función que encontramos dentro del proceso fagocítico, la información presente en la literatura describe tanto niveles aumentados como disminuidos, e incluso también inalterados con el envejecimiento. Así, en función de las condiciones experimentales empleadas en el estudio, se han observado resultados totalmente opuestos. Varios investigadores, en los que se incluye nuestro grupo de investigación, han detectado, con el envejecimiento, un aumento en los niveles de adherencia de neutrófilos de sangre periférica humana en ausencia y/o en presencia de estímulos como el péptido formilado (fMLP) y el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), tanto en hombres como en mujeres (Damtew *et al.*, 1990; De la Fuente *et al.*, 2008; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008). Este mismo aumento, al envejecer, de la capacidad de adherencia ha sido observado en macrófagos peritoneales de ratón (De la Fuente *et al.*, 2000; De la Fuente *et al.*, 2001). Sin embargo, al variar el tipo de estímulo y/o el sustrato que va a ser objeto de adhesión, observamos que, mientras a fibronectina los neutrófilos de personas mayores muestran una mayor adherencia tanto en ausencia de estímulo como en respuesta a TNF- $\alpha$  (pero no frente a otros estímulos como GM-CSF, fMLP o PMA), no ocurre así frente a laminina, donde tanto los jóvenes como las personas de edades avanzadas muestran niveles de adherencia similares (Tortorella *et al.*, 2000). Además, otros autores tampoco observan cambios con la edad frente al fibrinógeno, pero encuentran unos niveles disminuidos de adherencia frente al colágeno en personas mayores con respecto a jóvenes (Perskin y Cronstein, 1992).

Una vez fijado el neutrófilo sobre la pared vascular, éste lo extravasa y se dirige hacia el foco de la inflamación mediante señales quimioatrayentes, infiltrándose en el tejido, en el proceso conocido como **quimiotaxis**. Con la edad, los fagocitos, tanto neutrófilos circulantes humanos como macrófagos (de diversas localizaciones como el bazo, el timo, los nódulos

axilares y el peritoneo de distintas cepas de ratón y rata), muestran una reducida habilidad quimiotáctica hacia diversos agentes quimioatrayentes como fMLP, GM-CSF o zimosan (Niwa *et al.*, 1989; Di Lorenzo *et al.*, 1999; De la Fuente *et al.*, 2002; 2004a; 2004b; Fulop *et al.*, 2004; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a). Recientemente se ha demostrado que el comportamiento migratorio de los neutrófilos cambia en la década de los 60 años, dando lugar a una migración imprecisa y aberrante de los neutrófilos a mayor edad. Esta migración, a diferencia de las personas jóvenes, no puede ser inducida por la exposición a señales inflamatorias y quimiotácticas como TNF- $\alpha$ , CXCL8 (IL-8) y fMLP en las personas mayores (Sapey *et al.*, 2014). De hecho, en un estudio longitudinal realizado en 1989, Niwa y colaboradores correlacionaron una extrema disminución de la capacidad quimiotáctica, asociada a la edad, con la mortalidad en individuos de 69-72 años. Sin embargo, varios autores también han descrito una ausencia de cambios con la edad en la capacidad de quimiotaxis de los neutrófilos frente a fMLP y zimosan (Perskin y Cronstein, 1992; Biasi *et al.*, 1996; Stohlawetz *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 2000b; Simell *et al.*, 2011).

Por otro lado, una vez alcanzada la zona de infección, al avanzar la edad, los fagocitos presentan una menor **fagocitosis** de agentes extraños, tanto los neutrófilos circulantes como los monocitos y macrófagos tisulares de diversas localizaciones, como el bazo, el timo, los nódulos axilares y el peritoneo de distintas cepas de ratón y rata (De la Fuente, 1985; Butcher *et al.*, 2001; De la Fuente *et al.*, 2002; 2004a; 2004b; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a; Simell *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2014). No obstante, también existen resultados que apuntan a una ausencia de diferencias con la edad en esta función (Niwa *et al.*, 1989; Krause *et al.*, 1999).

Una vez ingerido el patógeno, se procederá a su eliminación. La destrucción se realiza mediante una serie de reacciones bioquímicas, gracias a las cuales se desencadena la **respuesta microbica**, que consiste en la producción de ROS y la liberación de enzimas líticas. Distintos grupos de investigación, utilizando técnicas y tipos de agentes estimulantes diferentes, han encontrado, prácticamente en todos los casos, una reducción en la actividad bactericida de neutrófilos al avanzar la edad, debido a menores niveles de producción de ROS (Walrand *et al.*, 2006; Simell *et al.*, 2011). En la generación de los ROS, proceso conocido como estallido respiratorio o oxidativo, el primer ROS que se genera es el anión superóxido

( $O_2^-$ ), gracias a la reducción de una molécula de oxígeno a través del sistema enzimático de la NADPH oxidasa. Los neutrófilos de personas mayores muestran una menor producción de  $O_2^-$  en comparación con jóvenes al ser estimulados mediante diversos agentes como fMLP, zimosan, GM-CSF, o tras ingerir *Staphylococcus aureus* o bolas de látex (Perskin y Cronstein, 1992; Biasi *et al.*, 1996; Di Lorenzo *et al.*, 1999; Tortorella *et al.*, 2000; Tsukamoto y Machida, 2012). Aunque también se han encontrado resultados opuestos, como un ligero aumento en la generación de  $O_2^-$  en respuesta a fMLP (Butcher *et al.*, 2001) e incluso ausencia de diferencias entre individuos mayores y jóvenes (Niwa *et al.*, 1989; Krause *et al.*, 1999).

Los cambios asociados a la edad en las **células "natural killer" (NK)** han sido los más extensamente estudiados dentro de la inmunidad innata, y se considera que sus alteraciones funcionales pueden contribuir de manera determinante a la mayor incidencia de enfermedades infecciosas y neoplásicas al envejecer. Además, tales alteraciones parecen estar correlacionadas directamente con una mayor mortalidad en individuos de edad avanzada, tanto humanos como roedores (Bruunsgaard *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2001; Mocchegiani *et al.*, 2003). Las NKs representan una población de linfocitos granulares que se pueden distinguir de las T y las NKT por su carencia del TCR y CD3, y por su maduración extratímica (Solana y Mariani, 2000; Mocchegiani y Malavolta, 2004), ya que aunque las NK comparten el mismo precursor de linfocitos T en médula ósea, experimentan su maduración en esta última localización (Galy *et al.*, 1995). La característica funcional principal de las células NK es su **actividad citotóxica**, dirigida contra las células infectadas por virus y cancerígenas, función que también muestra alteraciones al avanzar la edad. En la vejez se ha demostrado una disminución de dicha actividad citotóxica al analizarla por célula NK, tanto de las procedentes de sangre periférica humana de hombres y mujeres (Mariani *et al.*, 1996; Di Lorenzo *et al.*, 1999; Mocchegiani y Malavolta, 2004; Arranz *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008), como de los nódulos axilares, bazo, timo y peritoneo en roedores (Ferrández *et al.*, 1999; De la Fuente *et al.*, 2002; 2004a; Puerto *et al.*, 2005). Sin embargo, otros autores también han observado una ausencia de diferencias con la edad (Krishnaraj, 1997; Kutza y Murasko, 1994; 1996; Krause *et al.*, 1999). Estas discrepancias pueden ser debidas a: a) distintos criterios de selección/exclusión de los sujetos empleados para el estudio (uso o no del protocolo SENIEUR); b) el estado nutricional de los individuos, ya que la funcionalidad de las células NK puede ser alterado por variaciones nutricionales, como por ejemplo, niveles

bajos de zinc, elemento traza y cofactor esencial para una actividad óptima de las células NK, cuyos valores se encuentran correlacionados negativamente con la edad (Maes *et al.*, 1999), y/o c) diferencias metodológicas, como por ejemplo, la célula diana empleada para desencadenar la respuesta citotóxica (DelaRosa *et al.*, 2006; Mariani *et al.*, 2008). Cabe destacar que una actividad citotóxica alta se ha correlacionado con un estado de salud óptimo, tanto en jóvenes como en personas de edades avanzadas (Mysliwski *et al.*, 1993); y al contrario, una actividad citotóxica baja se ha propuesto como predictor de morbilidad (Ginaldi *et al.*, 1999). El hecho de que una actividad citotóxica bien preservada sea representativa de un buen estado de salud, hace suponer por qué en aquellos trabajos donde se han empleado sujetos mayores SENIEUR, no se encuentren diferencias en dicha función entre individuos de 20-40 años y de 62-88 años (Krause *et al.*, 1999).

### ***La inmunidad adaptativa***

El sistema inmunitario adaptativo, también conocido como *adquirido* o *específico*, está constituido por **linfocitos** B o T, y es el que provee al organismo de la "memoria inmunológica", por el cual cada patógeno es "recordado" por un antígeno característico y propio de ese patógeno en particular. Estos linfocitos son los principales constituyentes de lo que se denomina *inmunidad humoral* o *celular* en función de la célula inmunocompetente que medie la respuesta, respectivamente.

Cabe destacar que los mecanismos que emplean la inmunidad adaptativa y la innata están estrechamente ligados e interconectados, proporcionando en su conjunto la defensa contra los patógenos (Ginaldi *et al.*, 1999), por lo que la alteración de una afectaría a la funcionalidad de la otra (Pawelec *et al.*, 1998).

Son muchas y ampliamente descritas las causas que dan lugar a la alteración de la inmunidad adaptativa con el envejecimiento. Una de las características principales es la involución tímica, y en especial, la pérdida progresiva del espacio epitelial tímico, donde tiene lugar la timopoyesis. Esto provoca una menor eficacia en el desarrollo de células T, una disminución en la migración de células T *naïve* o vírgenes a la periferia, y por lo tanto, un repertorio restringido de células T, hecho que está relacionado con una mayor morbilidad y mortalidad en un amplio rango de escenarios clínicos (Lynch *et al.*, 2009). Además, la acumulación de linfocitos de memoria, en detrimento del fenotipo *naïve*, es un signo que se

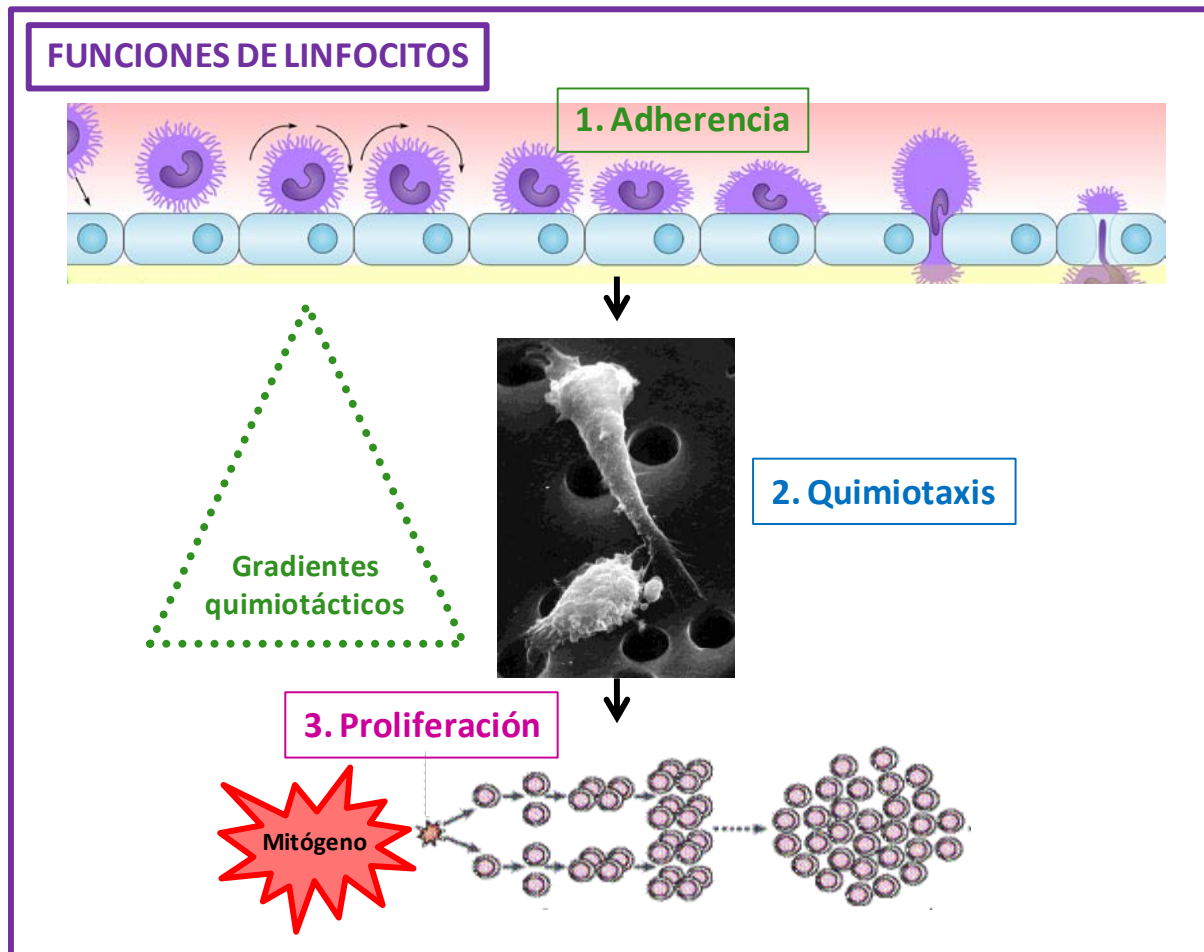
ha relacionado con la estimulación antigénica crónica a lo largo de toda la vida (Franceschi *et al.*, 2000a), ya que las infecciones persistentes, típicas en los mayores, contribuyen al agotamiento prematuro de células T y a la pérdida de la inmunovigilancia (Ongrádi y Kövesdi, 2010). De hecho, el deterioro en la capacidad del sistema inmunitario innato para eliminar agentes infecciosos, resulta en una inapropiada estimulación inmunitaria persistente y en unos niveles de antígenos que exceden a los necesarios para la activación de los linfocitos (Hasler y Zouali, 2005). Así, las células vírgenes son reemplazadas por una gran expansión clonal de células T CD28- anérgicas o no funcionales, células que se encuentran en fase de senescencia replicativa, y que se caracterizan por telómeros más cortos y una reducida capacidad proliferativa (Sanson *et al.*, 2008). Por lo tanto, los linfocitos T de individuos mayores poseen una disminución en el potencial de expansión clonal, lo que conduce a una función inmunitaria debilitada en el anciano, y que se traduce en una incapacidad a hacer frente a infecciones de larga duración y una memoria inmunológica más corta (Wick y Grubeck-Loebenstein, 1997).

Por otro lado, la respuesta inmunitaria humoral, llevada a cabo por los linfocitos B, también sufre cambios con la edad, entre los que se destaca la pérdida de linfocitos B *naïve* por células de memoria agotadas, y una reducción en la respuesta de dichas células a antígenos *nóveles* que resulta en una disminución en la capacidad de producir anticuerpos (Ongrádi y Kövesdi, 2010). Esto, junto con las alteraciones de los linfocitos T, apoya el hecho de que la efectividad terapéutica de la vacunación en individuos mayores es breve y poco efectiva (Wick y Grubeck-Loebenstein, 1997). Además, con el envejecimiento tiene lugar un aumento de la producción de autoanticuerpos (Zhao *et al.*, 1995).

Además, son muchas las evidencias que indican una alteración en la producción de citoquinas por parte de los linfocitos T y B, lo que también influiría sobre la respuesta funcional desempeñada por estas células (Gardner y Murasko, 2002). De hecho, se ha postulado que las citoquinas son una de las principales causantes de la remodelación que tiene lugar en el sistema inmunitario con el envejecimiento (Catania *et al.*, 1997; Castle *et al.*, 1999; McNerlan *et al.*, 2002; Boyman *et al.*, 2007), como se comentará más adelante.

Los linfocitos, al igual que los fagocitos, al comienzo de ejecutar su respuesta, poseen la capacidad de adherirse y de migrar hacia un foco infeccioso en respuesta a señales quimiotácticas (Doherty *et al.*, 1987; Hugli, 1989; Mackay e Imhof, 1993), con el fin de llegar

a las zonas donde pueden reconocer a los antígenos y realizar una adecuada proliferación (Fig. 3). Por lo tanto, estas funciones serán cruciales para la inmunovigilancia y el reconocimiento antigénico, ya que la iniciación de la respuesta inmunitaria dependerá críticamente de la movilidad de los linfocitos (Janeway y Goldstein 1991).



**Figura 3. Ilustración de las funciones llevadas a cabo por los linfocitos.** La adherencia, la quimiotaxis y la proliferación en respuesta a diversos estímulos como son los mitógenos (miméticos de los antígenos que pueden encontrarse *in vivo*), son funciones secuenciales esenciales para una adecuada inmunovigilancia y el reconocimiento antigénico.

Con el envejecimiento, sin embargo, algunos autores han descrito que los linfocitos muestran una mayor capacidad de **adherencia** (McArthur, 1998; Hirokawa, 1999; De la Fuente y Victor, 2000), si bien otros no han observado diferencias significativas entre individuos jóvenes y mayores en esta función (Stohlawetz *et al.*, 1996). Además, con la vejez, los linfocitos muestran una disminución de la **quimiotaxis** frente a diversos agentes quimioatrayentes como esfingosina 1 fosfato (S1P), CCL21 y fMLP, tanto las procedentes de



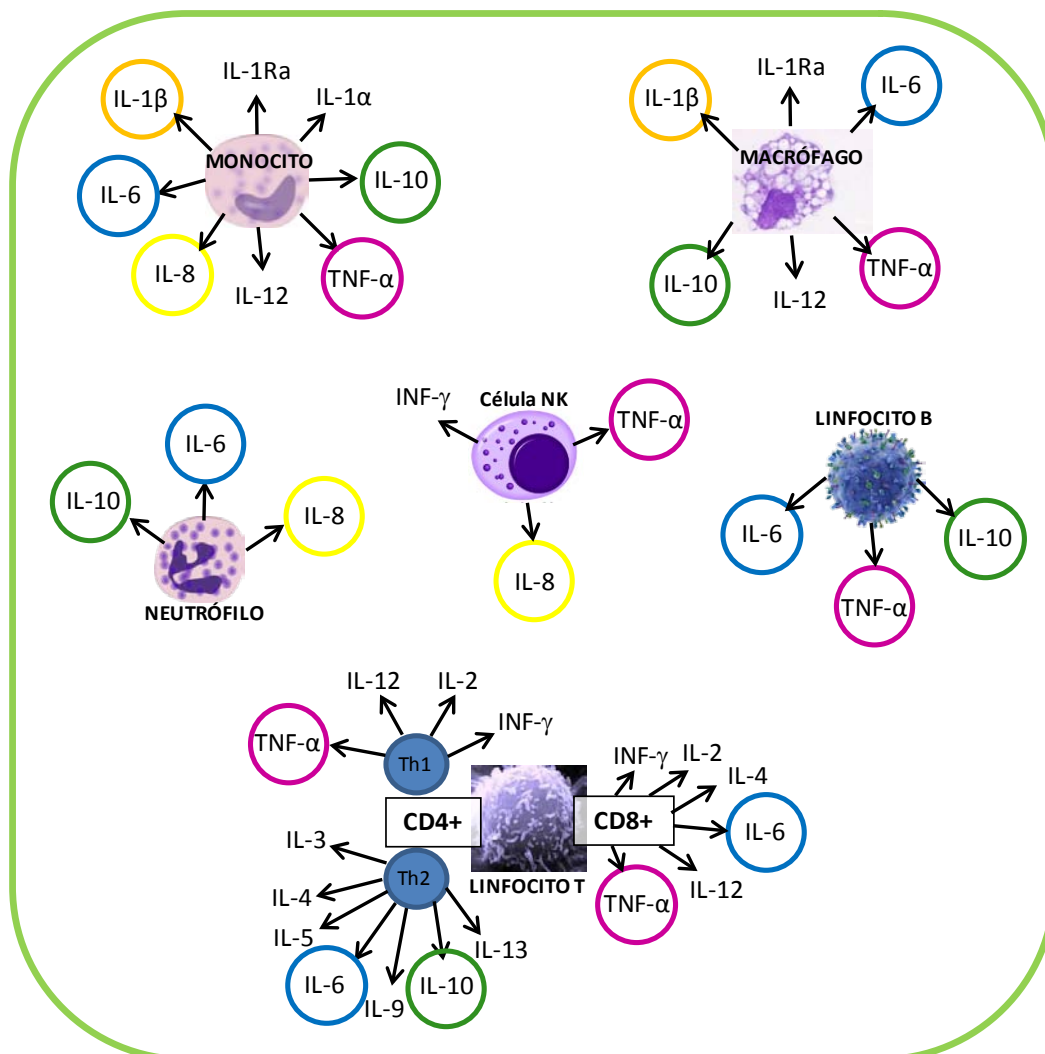
sangre periférica humana (Arranz *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011), como los de la cavidad peritoneal y de diversos órganos de roedores frente a fMLP (Ortega *et al.*, 2000; De la Fuente *et al.*, 2004a; Arranz *et al.*, 2010a).

Una vez alcanzada la zona donde se reconocerá al antígeno, la efectividad de la respuesta adaptativa parece recaer en la capacidad proliferativa de un número inicialmente pequeño de linfocitos T específicos para ese antígeno. Está ampliamente demostrado, mediante el uso de mitógenos *in vitro*, que la **respuesta proliferativa** de los linfocitos se encuentra disminuida con la edad. Este hecho se ha comprobado en aquellos linfocitos procedentes de sangre periférica humana que se han estimulado en presencia de fitohemaglutinina (PHA) y concanavalina A (ConA), mitógenos específicos de linfocitos T (Inkeles *et al.*, 1977; Gillis *et al.*, 1981; Song *et al.*, 1993; Arranz *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008). También, en los linfocitos extraídos de la cavidad peritoneal y de otros órganos de roedores y que responden a ConA y lipopolisacárido (LPS; estimula a monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos B) (Medina *et al.*, 2000a; De la Fuente *et al.*, 2004a; Simioni *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2010a). Pese a que también existen trabajos donde no se observan cambios en la capacidad proliferativa de los linfocitos frente a PHA con la edad (Fagiolo *et al.*, 1993), otros, en estudios longitudinales, relacionan una baja respuesta proliferativa junto con niveles altos en el porcentaje de linfocitos CD8+ y bajos de CD4+ y CD19+, con una mayor tasa de mortalidad (Ferguson *et al.*, 1995). De la misma forma, otros investigadores relacionan un patrón de respuesta inmunitaria caracterizado por una baja respuesta proliferativa de linfocitos T, una producción disminuida de IL-2 y un alto porcentaje y número de linfocitos CD8+, como marcadores predictivos de una subsecuente mortalidad (Pawelec *et al.*, 1995).

### **Las citoquinas**

Todas las actividades funcionales de la inmunidad innata y adaptativa, descritas anteriormente, requieren la participación de las citoquinas, proteínas que desempeñan un papel central regulando la función de las células que las producen y otros tipos celulares. Todos los componentes celulares de la inmunidad innata y adquirida producen citoquinas, siendo responsables de la comunicación intercelular, y moduladores de la función efectora durante la respuesta inmunitaria, y por lo tanto, juegan un papel clave en la regulación del

tipo y extensión de dicha respuesta. Así, a través de la activación de receptores específicos de membrana, inducen las funciones de proliferación y de diferenciación celular, la quimiotaxis, el crecimiento y la modulación de la secreción de inmunoglobulinas (Ginaldi *et al.*, 1999; McNerlan *et al.*, 2002). Según la célula que las produzca se denominan linfoquinas (linfocito), monoquinas (monocito) o interleuquinas (IL; células hematopoyéticas), pero también pueden ser clasificadas como quimioquinas, independientemente de su procedencia, si su función es la de inducir quimiotaxis. Además, cabe destacar que la mayoría de las citoquinas pueden ser producidas por distintos componentes celulares del sistema inmunitario (Fig. 4).



**Figura 4. Principales citoquinas producidas y liberadas por los distintos componentes celulares del sistema inmunitario.** Ciertas citoquinas como IL-6, IL-10 o TNF- $\alpha$ , pueden ser generadas por prácticamente todos los leucocitos de la inmunidad innata y adaptativa.

Con el envejecimiento, se ha descrito una alteración en el equilibrio de la red de citoquinas reguladoras producidas por los leucocitos durante la respuesta inmunitaria, tanto de aquellas que estarían producidas durante la respuesta inmunitaria innata (Gon *et al.*, 1996; Krabbe *et al.*, 2001), como las producidas por los linfocitos durante la respuesta adaptativa (Lio *et al.*, 1998; McNerlan *et al.*, 2002; Linton y Dorshkind, 2004). Además, los hallazgos realizados sobre los cambios en el patrón de producción de citoquinas durante la respuesta inflamatoria innata indican que, como resultado de este microambiente de citoquinas alterado, el *crosstalk* o diálogo cruzado entre la inmunidad innata y adaptativa *in vivo* estará alterado (van den Biggelaar *et al.*, 2004b).

Tradicionalmente, las células T CD4<sup>+</sup> han sido clasificadas en T helper (Th) 1 y Th2, basado en su perfil de producción de citoquinas; IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  para las respuestas de tipo Th1 o celular, e IL-10, IL-4, IL-6, IL-13 para las respuestas de tipo Th2 o humoral (Mossman y Sad, 1996). Con el envejecimiento, sin embargo, son numerosos los estudios que proponen un cambio en el sistema Th1/Th2, pasándose de una respuesta predominantemente Th1 a una predominantemente Th2, lo que acompañaría una alteración en el perfil de citoquinas, como un mecanismo de la disfunción que tiene lugar con la edad en el sistema inmunitario (Shearer, 1997; Alberti *et al.*, 2006). Sin embargo, no todos los investigadores han observado un simple cambio en el patrón de citoquinas hacia Th2 (Castle *et al.*, 1999; Karanfilov *et al.*, 1999), sugiriendo que la alteración de la red de interacciones de citoquinas es algo más complicado que un simple cambio unidireccional. De hecho, algunos autores han sugerido que el microambiente donde se desarrollan las células T CD4<sup>+</sup> es determinante a la hora de establecer las proporciones de los subtipos que las componen (Chipeta *et al.*, 1998; Sakata-Kaneko *et al.*, 2000). Además, hace unos años se describió un tercer subtipo efector, conocido como Th17 y caracterizado por producir IL-17 (Weaver *et al.*, 2007). Así, el escenario se hace más complejo a medida que se proponen otros subtipos celulares de acuerdo con la citoquina que producen y sus efectos funcionales. Así, recientemente se han descrito más células T reguladoras, como Tr1 (TGF- $\beta$ ) o Tr3 (IL-10), así como otras células Th, como Th9 (IL-9) o Th22 (IL-22) (Annunziato y Romagnani, 2009; Noelle y Nowak, 2010).

Con el envejecimiento, el cambio mencionado como más ampliamente aceptado en el patrón de citoquinas, provoca un aumento progresivo del estado pro-inflamatorio, lo que

paradójicamente produce una disminución global en la capacidad para afrontar los retos derivados de agentes dañinos. Este fenómeno es conocido como “**inflamm-aging**”, que aunque de bajo grado, es de carácter crónico (Franceschi *et al.*, 2000b). Se ha postulado que este proceso es debido a la continua carga antigénica que padecen los individuos a lo largo de toda su vida, y especialmente en las últimas décadas de la misma, ya que el antígeno se consideraría como un tipo de “agente estresor”. A su vez, el aumento del estado pro-inflamatorio estaría condicionado por el *background* genético de cada persona, ya que se conocen variantes genéticas o genotipos que predisponen a tener un perfil de citoquinas más o menos pro-inflamatorio, polimorfismos que se han relacionado con el alcance de la longevidad (Franceschi *et al.*, 2000b; Caruso *et al.*, 2004). Sin embargo cabe destacar que el proceso del envejecimiento no estaría determinado en sí mismo por la genética, sino por un proceso aleatorio o al azar que implica la pérdida de la fidelidad molecular, lo que llevaría a un aumento de la entropía celular (Salminen y Kaarniranta, 2010).

Sin embargo, hay que destacar que la inflamación, y específicamente las citoquinas pro-inflamatorias son necesarias, ya que tienen un papel esencial en la inducción de una respuesta de defensa apropiada del hospedador frente a infecciones y cáncer, y por lo tanto es crucial para la supervivencia (Franceschi, 2007). De hecho, se ha comprobado que los sujetos de 85 años de edad cuyos leucocitos circulantes producen, tras una estimulación con LPS, niveles bajos de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , pero también de IL1-ra e IL-10, poseen dos veces más riesgo de mortalidad en comparación con los que tienen mayores niveles de citoquinas pro- y/o anti-inflamatorias (van den Biggelaar *et al.*, 2004b). Por el contrario, una sobreproducción de citoquinas pro-inflamatorias, en ausencia de un control adecuado, carecería de papel de protección frente a enfermedades infecciosas, pudiendo inducir daño tisular y potenciando el shock séptico; y lo que es más, constituiría un factor de riesgo para padecer enfermedades relacionadas con la inflamación (Biasucci *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2000; Ridker *et al.*, 2002; van den Biggelaar *et al.*, 2004a). Por tanto, una regulación óptima de los niveles de las citoquinas es esencial para lograr una adecuada efectividad del sistema inmunitario.

Así, la desregulación del perfil de citoquinas hacia un estado pro-inflamatorio, característico del envejecimiento, contribuye a procesos patológicos asociados a la edad. De hecho, los estudios epidemiológicos sugieren que la inflamación crónica de bajo grado o

“inflamm-aging”, provoca un perfil aterogénico, y está asociado a desórdenes como el Alzheimer, la demencia, la osteoporosis y la diabetes tipo II, entre otros. Como ejemplo, la elevación sistémica de bajo grado de IL-6 y TNF- $\alpha$  se ha relacionado con enfermedades cardiovasculares, y el Alzheimer y la diabetes de tipo II con el aumento de TNF- $\alpha$  (Bruunsgaard, 2002). Además, gracias a los estudios longitudinales de cohortes de sujetos mayores se ha descrito que muchos de los mediadores pro-inflamatorios son fuertes predictores de mortalidad por cualquier causa (Krabbe *et al.*, 2004).

Por lo tanto, al igual que se ha mencionado anteriormente para la inmunosenescencia, los efectos beneficiosos de la inflamación dedicado a la neutralización de agentes peligrosos o dañinos para el organismo en edades tempranas de la vida, se volvería perjudicial al envejecer, en un periodo que, como ya se ha mencionado anteriormente, no está previsto por la evolución (Franceschi *et al.*, 2000b).

Al determinar los niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias, tanto en el plasma como en el suero, con el envejecimiento se han descrito unos valores aumentados de toda una serie de citoquinas como: **IL-1 $\beta$**  (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012), mediador clave en la respuesta inflamatoria aguda; **IL-6** (Cohen *et al.*, 1997; Myśliwski *et al.*, 1998; Giuliani *et al.*, 2001; Ferrucci *et al.*, 2005; Himmerich *et al.*, 2006; Mariani *et al.*, 2006; Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012), citoquina multifuncional con actividad tanto pro- como anti-inflamatoria; **IL-8** (Mariani *et al.*, 2006), potente factor quimiotáctico o quimioquina de neutrófilos; **TNF- $\alpha$**  (Fagiolo *et al.*, 1993; Haack *et al.*, 1999; Bruunsgaard *et al.*, 2000b; Himmerich *et al.*, 2006; Kaszubowska *et al.*, 2011; Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012), citoquina pro-inflamatoria por excelencia, mediador temprano de la respuesta de fase aguda e implicado en la producción de quimioquinas, IL-6 y PCR, y el reclutamiento de leucocitos durante las reacciones inflamatorias (Bruunsgaard *et al.*, 2000c). Así mismo, otros mediadores pro-inflamatorios también se encuentran aumentados con el avance de la edad, como el **receptor soluble de IL-6 (sIL-6R)** (Giuliani *et al.*, 2001; Ferrucci *et al.*, 2005), un componente soluble que facilita la señalización de IL-6. No obstante, hay que destacar la existencia de discrepancias en la bibliografía ya que algunos autores no detectan cambios asociados con la edad en los niveles plasmáticos de sIL-6R (Maggio *et al.*, 2006), ni tampoco en los de TNF- $\alpha$  (Fagiolo *et al.*, 1993), e incluso otros autores describen que los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en plasma son indetectables en la mayoría de los sujetos (Catania *et al.*, 1997).

Por otra parte, con un fin compensatorio o neutralizador, también se ha descrito un aumento, en plasma o suero, de citoquinas y/o mediadores anti-inflamatorios, como la **IL-10** (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012), inhibidor de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias; y el **receptor soluble I y II de TNF (sTNF-RI y -RII)** (Catania *et al.*, 1997; Haack *et al.*, 1999; Gerli *et al.*, 2000; Himmerich *et al.*, 2006), ambos neutralizadores del TNF- $\alpha$ .

Por otro lado, se ha descrito que la **IL-2**, factor de crecimiento de linfocitos T, esencial para inducir la respuesta proliferativa de los linfocitos, disminuye con el envejecimiento en el plasma (Myśliwski *et al.*, 1998).

Sin embargo, la procedencia de las citoquinas circulantes no tiene porqué ser exclusivamente derivada de la producción de los componentes celulares del sistema inmunitario, ya que otras células del organismo también las pueden producir. Así, los adipocitos son capaces de producir toda una serie de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Los factores reguladores de la liberación de estas citoquinas procedentes del tejido adiposo parecen ser estímulos inflamatorios usuales como el LPS, pero también sería determinante el tamaño de la célula grasa *per se* y la presencia de catecolaminas. El papel de estas citoquinas, llamadas adipoquinas, sería la de regular el metabolismo del tejido adiposo, disminuyendo la acumulación de lípidos (Coppack, 2001). Con el envejecimiento, se ha comprobado que el tejido adiposo, y específicamente los adipocitos de ratones viejos, expresan mayores niveles del ARNm de estas citoquinas pro-inflamatorias y de la ciclooxygenasa 2 (COX-2), lo que se ha visto que puede provocar la inducción de una mayor respuesta inflamatoria en otras células, como por ejemplo en los macrófagos peritoneales (Wu *et al.*, 2007). Además, el tejido adiposo, y concretamente la visceral, la cual aumenta significativamente con la edad, sería un importante contribuyente, con el envejecimiento, del aumento plasmático de estos marcadores inflamatorios (Pedersen *et al.*, 2003b; Cartier *et al.*, 2009).

También está ampliamente demostrado que el músculo esquelético produce IL-6, especialmente durante el ejercicio, liberándose a la circulación sanguínea y contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y mediando la lipólisis (Pedersen *et al.*, 2001). Así, la IL-6 liberada por el músculo contráctil actuaría como una hormona para movilizar sustratos extracelulares y/o aumentar la entrega de sustrato durante el ejercicio. Además, esta citoquina ejercería un efecto anti-inflamatorio e inmunoregulador ya que

inhibe la producción de TNF- $\alpha$ , y durante el ejercicio, inhibe la resistencia a insulina inducida por TNF- $\alpha$  en tejidos periféricos. Por lo tanto, la IL -6, clasificada inicialmente como pro-inflamatoria, poseería a su vez acciones anti-inflamatorias, jugando un papel importante en los efectos beneficioso del ejercicio (Pedersen *et al.*, 2003a), lo que ha dado lugar a una gran controversia debido a su doble cara, pro- y anti-inflamatoria. De hecho, también se encuentra descrito que una producción excesiva de IL-6 por el músculo esquelético posee efectos perjudiciales como la sarcopenia (Beyer *et al.*, 2012).

Además, las células vasculares pueden ser tanto dianas como fuentes de citoquinas, producción que se ve aumentada con la edad. En la pared arterial de la aorta se ha descrito, en ratas viejas, un aumento en la producción de IL-6 en ausencia de cualquier estímulo. En presencia de LPS, además de una mayor producción de IL-6, tiene lugar una gran producción de TNF- $\alpha$  en comparación con lo que sucede en las ratas adultas. Este hecho reflejaría una importante implicación de estas dos citoquinas pro-inflamatorias en la remodelación de arterias y en la aparición de enfermedades cardiovasculares con la edad (Belmin *et al.*, 1995).

Por lo tanto, los elevados niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias, una de las características del “inflamm-aging”, no procederían únicamente de las células del sistema inmunitario.

Son numerosas las publicaciones referentes a los niveles de citoquinas producidas durante una determinada respuesta inmunitaria frente a un estímulo *in vitro* en personas de distintas edades, con el fin de determinar la desregulación existente derivada del deterioro del sistema inmunitario con el envejecimiento. Sin embargo, estos estudios muestran frecuentemente resultados contradictorios. El origen de la controversia en los niveles de citoquinas con la edad pueden ser varios, como por ejemplo, el estado de los sujetos analizados, su edad, la procedencia y procesamiento de la muestra biológica, y especialmente, la metodología empleada para desencadenar la respuesta inmunitaria *in vitro* o *ex vivo*. Todos estos factores contribuirían a la obtención de resultados distintos, con la consiguiente controversia indicada, incluso para una misma citoquina (Alonso-Fernández y De la Fuente, 2011).

Así, en la bibliografía sobre una misma citoquina, puede ser observada que aumenta, que no cambia, o que disminuye con el envejecimiento, en función del contexto donde haya

sido valorada. En ausencia de cualquier tipo de estímulo y en presencia de **LPS** (mitógeno que principalmente estimula a monocitos/macrófagos y neutrófilos), los **sobrenadantes de cultivo de sangre completa** de personas mayores presentan grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ , en relación a los jóvenes (Rink *et al.*, 1998; Sadeghi *et al.*, 1999; Gabriel *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos autores, no describen variaciones en ausencia de estímulo en los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en este tipo de muestra (Hernanz *et al.*, 1996). Además, otros autores, exponen una disminución en la liberación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , y ausencia de diferencias en los niveles de IL-6 en los sobrenadantes de células sanguíneas enfrentadas a LPS (Bruunsgaard *et al.*, 1999b), así como niveles aumentados de IL-1 $\beta$  pero similares de TNF- $\alpha$  al comparar sujetos jóvenes y mayores (Riancho *et al.*, 1994). Los niveles de IL-10 disminuyen con la edad en este tipo de muestra (van den Biggelaar *et al.*, 2004b).

Por otro lado, los **sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)**, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), células obtenidas tras la realización de un protocolo de aislamiento donde se encontraría, teóricamente, una proporción de 1 monocito por 10 linfocitos, presentan una ausencia de variaciones en los niveles de IL-1 $\beta$  (Gabriel *et al.*, 2002; Pietschmann *et al.*, 2003) e IL-8 (Gabriel *et al.*, 2002), una menor producción de IL-2 (Nagel *et al.*, 1988), y un aumento de IL-10 (Castle *et al.*, 1999), TNF-alfa (Myśliwska *et al.*, 1999) e IL-6 (Fagiolo *et al.*, 1993; Beharka *et al.*, 2001) en presencia de **PHA** (mitógeno que estimula principalmente linfocitos T) al avanzar la edad. Sin embargo, también existen discrepancias en los resultados encontrados en la literatura, ya que algunos autores han descrito un aumento de IL-1 $\beta$  (Fagiolo *et al.*, 1993), o una ausencia de diferencias en la producción de IL-2 con la edad (Bruunsgard *et al.*, 2000a).

Por lo tanto, el comportamiento celular en lo referente a la liberación de citoquinas por parte de las células inmunitarias variará en función del tipo leucocitario presente y del desencadenante empleado a la hora de monitorizar una respuesta inmunitaria. Además, no todos los leucocitos contribuirán en la misma medida al “inflamm-aging” descrito en el envejecimiento.



### 1.1.6. La oxidación-inflamación como causa y efecto de la inmunosenescencia

Ya se ha comentado anteriormente que una buena justificación del cómo envejecemos no sólo debe servir a los distintos niveles de organización biológica de un mismo individuo, sino que también debe ser de aplicación general, lo que sugiere que la causa de la inmunosenescencia debe ser la misma que la responsable de la senescencia de otras células del organismo (De la Fuente y Miquel, 2009).

Un gran número de pruebas recogidas a lo largo de las últimas décadas apuntan al estrés oxidativo como principal contribuyente de los procesos relacionados con el envejecimiento, donde incluiríamos la inmunosenescencia, así como de la patogénesis de numerosas enfermedades relacionadas con la edad, como el cáncer, la hipertensión, la aterosclerosis o las enfermedades neurodegenerativas (Ames *et al.*, 1993; Mecocci *et al.*, 2000; Daynes *et al.*, 2003; De la Fuente *et al.*, 2005; De la Fuente y Miquel, 2009; Salminen y Kaarniranta, 2010). Así, como proponía la teoría del envejecimiento de los radicales libres, ya en el año 1956, y que ha sido comentada anteriormente, las acciones deletéreas de los radicales libres serían los responsables del deterioro funcional asociado al envejecimiento (Harman, 1956).

Las numerosas fuentes de compuestos oxidantes, tanto endógenas (p. ej. como consecuencia de la respiración aerobia o la derivada de la producción de los leucocitos) como exógenas (p. ej. la dieta) hacen necesarios mecanismos de defensa antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, los cuales se encuentran presentes en todas las células y fluidos del organismo (Ames *et al.*, 1993). Sin embargo, con la edad se pierde la capacidad de mantener un adecuado equilibrio redox debido al aumento de sustancias oxidantes y/o a la disminución de antioxidantes. Esto da como resultado la aparición del estrés oxidativo, evento que origina el daño a diversas biomoléculas como los lípidos, las proteínas, los carbohidratos y los ácidos nucleicos (Gil *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2007; Siomek *et al.*, 2007; Pandey y Rizvi, 2010; Cannizzo *et al.*, 2011).

Las células inmunitarias, y especialmente aquellas que forman parte de la inmunidad innata, constituyen una de las principales fuentes de los radicales libres, ya que en ellas se generan grandes cantidades de ROS que actúan como componentes microbicidas altamente reactivos, con el fin de llevar a cabo la defensa del hospedador frente a organismos invasores, en el proceso conocido como estallido oxidativo (Morel *et al.*, 1991). Así, el

balance oxidante/antioxidante es, si cabe, más importante en estas células ya que es un factor determinante para su función, donde se incluye la integridad y funcionalidad de sus membranas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos, y el control de las señales de transducción y expresión génica que se llevan a cabo en los leucocitos, todos éstos, dianas sensibles a la acción deletérea de los oxidantes (Meydani *et al.*, 1995). De hecho, con el envejecimiento se ha observado, en general, un aumento en la formación de radicales libres y un deterioro en la capacidad de neutralizar estos compuestos debido a la disminución de los mecanismos de defensa antioxidante de las células inmunitarias. El exceso de compuestos oxidantes provocará, consecuentemente, el fenómeno conocido como daño oxidativo en las biomoléculas arriba citadas, lo que comprometerá la funcionalidad de las organelas, los compartimentos, las membranas y por consiguiente de las células en general (Meydani *et al.*, 1995; De la Fuente y Miquel, 2009; Cannizzo *et al.*, 2011). Así, la pérdida en la fluidez de las membranas debido a modificaciones oxidativas en los ácidos grasos poliinsaturados y en las proteínas que las componen, afecta a la estructura y formación de las balsas lipídicas, esenciales para el ensamblaje de complejos de señalización y la fagocitosis, funciones clave para una adecuada respuesta inmunitaria. Además, el daño oxidativo en la membrana de la mitocondria, y la acumulación de pigmentos de lipofuscina compromete la eficacia del estallido oxidativo en los leucocitos de individuos mayores (Cannizzo *et al.*, 2011). A su vez, el deterioro asociado a la edad en la inmunidad adaptativa también podría ser el resultado de la disminución de compuestos y actividades de enzimas antioxidantes. De hecho, estudios *in vitro* han demostrado que tanto los leucocitos PMN como los macrófagos pueden inhibir la proliferación de los componentes celulares de la inmunidad adaptativa y de células NK, a través de la producción de ROS, prostaglandina E2 (PGE2) y óxido nítrico (NO), comprometiendo su función (Ames *et al.*, 1993).

Por lo tanto, la necesidad de cantidades óptimas de compuestos antioxidantes es un aspecto vital para el mantenimiento de la respuesta inmunitaria. En este sentido, uno de los sistemas de defensa endógeno más importante contra el estrés oxidativo es el **glutatión**, un antioxidante tiólico no proteico, intracelular y ubicuo, que en su forma reducida (GSH) se encuentra implicado en numerosas funciones celulares, como en la síntesis de ADN y proteínas, en el transporte de aminoácidos, en la activación de enzimas, en los procesos de señalización celular, en la regeneración de otros antioxidantes importantes, en el

mantenimiento de los grupos –SH proteicos de la membrana en su forma reducida, y en la protección de las células mediante la neutralización de radicales libres, como el radical hidróxilo (OH<sup>•</sup>), el más dañino de todos ellos (Meydani *et al.*, 1995; Valko *et al.*, 2007; Pandey y Rizvi, 2010). Cabe destacar que son numerosos los estudios que han demostrado una estrecha relación entre el GSH y la función inmunitaria, por lo que unos niveles intracelulares de glutatión óptimos son esenciales para generar una respuesta inmunitaria apropiada (Meydani *et al.*, 1995). Sin embargo, con el envejecimiento tiene lugar una disminución de los niveles de glutatión total y GSH en leucocitos peritoneales de ratón, así como en estas células en diversas localizaciones de humanos. También disminuyen en eritrocitos, y en plasma, tanto en hombres como en mujeres (Samiec *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2008; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a), lo que ha llevado a proponerlo como predictor de morbilidad y mortalidad (Meydani *et al.*, 1995). Además, su forma oxidada, el glutatión disulfuro o GSSG, muestra unos niveles mayores en leucocitos peritoneales de ratones viejos, y en el plasma y sangre completa de hombres y mujeres al avanzar la edad (Samiec *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2010a). Esto resulta en un aumento del cociente GSSG/GSH, que indicaría un mayor grado de oxidación, el cual se ha observado en leucocitos peritoneales de ratón y en plasma de humanos (Jones *et al.*, 2002; De la Fuente *et al.*, 2004b).

Por otro lado, también se han observado variaciones asociadas a la edad en la actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos. La **catalasa** es una enzima con actividad peroxidasa que protege a las células del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado dentro de ellas, y juega un papel importante en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de la célula (Matés *et al.*, 1999). Esta enzima muestra un aumento significativo de su actividad con la edad en eritrocitos y en plasma procedente de humanos (Inal *et al.*, 2001; Kasapoglu y Ozben, 2001; Junqueira *et al.*, 2004; Rizvi y Maurya, 2007), aunque también se ha descrito una ausencia de diferencias con el envejecimiento en leucocitos peritoneales de ratón y en eritrocitos y neutrófilos de hombres y mujeres de 65-75 años de edad en relación a personas más jóvenes (Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a).

En cuanto a las fuentes de ROS, cabe destacar una enzima oxidante, la **xantina oxidasa**, responsable del catabolismo de las purinas y que juega un papel importante en enfermedades relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo (Harrison, 2004). La

actividad de esta enzima, que es una de las principales fuentes citoplasmáticas de ROS, como son el  $O_2^{\cdot -}$  y el  $H_2O_2$ , aumenta con el envejecimiento en diversas localizaciones de roedores, como el hígado, la corteza cerebral, los leucocitos peritoneales y el plasma (Arranz *et al.*, 2010a; Vida *et al.*, 2011; 2014), así como en el plasma de humanos (Aranda *et al.*, 2007).

Los compartimentos biológicos más extensamente estudiados en relación al estado oxidativo de un organismo son el plasma y los eritrocitos, aunque son pocos y muchas veces contradictorios los datos en relación a la población sana (Pandey y Rizvi, 2010). En este sentido, la **capacidad antioxidante total** (TAC, del inglés *Total Antioxidant Capacity*), que considera la acción acumulativa de todos los antioxidantes presentes en el plasma y homogenados de tejidos, provee un parámetro integrado del estado oxidativo de un organismo (Ghiselli *et al.*, 2000), y es una de las valoraciones más empleadas. El plasma en concreto posee unas fuertes propiedades antioxidantes debido a la presencia de una infinidad de compuestos con capacidad reductora, de entre los cuales cabe destacar el ascorbato o vitamina C, el urato y el tocoferol o vitamina E (Wayner *et al.*, 1985). De hecho, la falta de antioxidantes en el plasma, como por ejemplo el ascorbato, hace de éste extremadamente vulnerable al estrés oxidativo y susceptible al daño peroxidativo (Frei *et al.*, 1989). Cabe destacar que una gran fracción de antioxidantes, asociados a proteínas y lipoproteínas, se encuentra sin identificar, siendo éstos los que más aportan al valor de TAC, aporte que además aumenta con el envejecimiento, especialmente en las mujeres (Wayner *et al.*, 1985; Aejmelaeus *et al.*, 1997). Independientemente a este hecho, con el envejecimiento, se ha descrito una disminución asociada a la edad de TAC en el plasma de hombres y mujeres (Rizvi *et al.*, 2006), aunque también se han expuesto resultados opuestos y dependientes del género (Aejmelaeus *et al.*, 1997). El gran número de resultados contradictorios que aporta la bibliografía en lo referente a los niveles de TAC es debido, principalmente, a la existencia de numeroso protocolos metodológicos válidos para su cuantificación, que además no muestran correlaciones satisfactorias entre sí (Bartosz, 2010).

Una de las consecuencias del elevado estrés oxidativo es la peroxidación lipídica o lipoperoxidación, procedente de la acción de los ROS sobre los lípidos. Esta degradación oxidativa, que afecta principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados, causa el deterioro del funcionamiento de las membranas biológicas, alterando su estructura, integridad, fluidez

y permeabilidad (Pandey y Rizvi, 2010). Uno de los productos secundarios derivados de este proceso son los **isoprostanos**, una familia de eicosanoides de origen no enzimático que se forman durante la peroxidación del ácido araquidónico. En concreto el 8-isoprostano (8-*iso* Prostaglandina F<sub>2α</sub>) ha sido propuesto como marcador de déficit de antioxidantes y estrés oxidativo. De hecho, sus niveles se encuentran elevados en varias enfermedades como las cardiovasculares, la artritis reumatoide, la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis y la diabetes mellitus (Valko *et al.*, 2007). Los individuos sanos poseen cantidades modestas de este isoprostano en plasma, y a pesar de la escasez de datos en la bibliografía, obtenidos bajo condiciones fisiológicamente normales, con el envejecimiento se ha descrito un aumento de sus niveles en orina y en líquido cefalorraquídeo (Wang *et al.*, 1995; Peskind *et al.*, 2014).

Además, los hallazgos de los últimos años evidencian una estrecha relación entre la oxidación y la inflamación, ya que una producción excesiva o descontrolada de radicales libres puede inducir una respuesta inflamatoria, a través del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB, del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), factor de transcripción sensible al estado redox que juega un papel central en la regulación de procesos inflamatorios y en la “inflamm-aging” (Kwon *et al.*, 2001; Daynes *et al.*, 2003; Sarkar y Fisher, 2006; Salminen *et al.*, 2008; Salminen y Kaarniranta, 2010; Cannizzo *et al.*, 2011). Así, los radicales libres podrían ser considerados como efectores de la inflamación, y a pesar de que la inflamación no es un fenómeno negativo *per se*, cuando los niveles de los compuestos inflamatorios exceden a los anti-inflamatorios, se produce un desequilibrio que da lugar al estrés inflamatorio (Kulinsky, 2007). De hecho, la inflamación crónica es el principal factor de riesgo subyacente al envejecimiento y enfermedades asociadas a la edad. Cabe destacar además, que los compuestos inflamatorios como el TNF-α pueden, a su vez, activar el NF-κB, entrando en una espiral viciosa (Gupta y Gollapudi, 2005; De la Fuente y Miquel, 2009).

Con el envejecimiento, toda una serie de compuestos pro-inflamatorios se encuentran elevados, como la actividad de la COX-2, los niveles de muchas prostaglandinas, o la **proteína C reactiva (PCR)** (Bruunsgard *et al.*, 2000a; Ferrucci *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2009), además de las citoquinas pro-inflamatorias anteriormente citadas en el apartado correspondiente a las citoquinas. Por lo tanto, la preservación de una función inmunitaria

apropiada, manteniendo la integridad y la salud del individuo y aumentando la posibilidad de alcanzar un envejecimiento exitoso no sólo pasaría por conservar un adecuado equilibrio redox, sino también por mantener un adecuado balance entre compuestos pro- y anti-inflamatorios (Franceschi, 2007; Chung *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta todo lo mencionado hasta el momento, la teoría de la oxidación-inflamación y la propuesta de una *oxi-inflamm-aging* (De la Fuente y Miquel, 2009) aportaría una visión completa e integradora de los complejos procesos que tienen lugar con el envejecimiento.

### **1.1.7. El sistema inmunitario como marcador de edad biológica y predictor de longevidad**

Como ya ha sido comentado, a medida que la edad media de la población crece, aumenta, a su vez, la vulnerabilidad a diversas patologías, especialmente las infecciosas, en términos de incidencia y severidad (Tarazona *et al.*, 2002). Este hecho, que tiene lugar debido a la remodelación del sistema inmunitario con el envejecimiento, junto con la observación de que una inmunidad deprimida está asociada a un aumento de la mortalidad en personas mayores, ha llevado a demostrar que el sistema inmunitario no es sólo un excelente marcador de salud, sino también de longevidad (Wayne *et al.*, 1990). Así, en las últimas dos décadas, los inmunogerontólogos están tratando de identificar cuáles de las múltiples alteraciones de los parámetros inmunitarios hasta ahora descritos están causalmente relacionados con un estado de salud clínicamente desfavorable, con el fin de conocer los mecanismos que subyacen al envejecimiento inmunológico, e intervenir para restablecer una inmunidad adecuada con los beneficios que ello conlleva: una mayor longevidad saludable. Esto supone un enorme reto ya que requiere estudios longitudinales en especies de larga vida, como es la nuestra (Derhovanessian *et al.*, 2009).

Uno de los estudios más importantes del área de la inmunogerontología, el estudio OCTO, fue llevado a cabo en una gran cohorte de personas suecas de 86-92 años de manera longitudinal. En él, los individuos fueron seleccionados independientemente de su estado de salud (sólo el 9% reunían los criterios para ser incluidos en el protocolo SENIEUR) (Wikby *et al.*, 1994), observando que aquellos sujetos que mostraban una baja respuesta proliferativa de los linfocitos T frente a ConA, junto con un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8+,

y bajos niveles de linfocitos T CD4+ y CD19+, mostraban una menor longevidad (Ferguson *et al.*, 1995). El seguimiento de los individuos de este estudio, posteriormente, dio lugar al estudio NONA donde se describió un fenotipo de riesgo inmunitario (IRP, del inglés *Immunological Risk Phenotypes*) definido por: un número alto y bajo de linfocitos CD8+ y CD4+, respectivamente, un cociente CD4/CD8 invertido, una respuesta linfoproliferativa pobre caracterizado por un aumento en el número de células CD8+CD28-CD27-, una baja capacidad de respuesta a IL-2, y una infección de citomegalovirus persistente (Wikby *et al.*, 2002). Así, estos parámetros, conjuntamente, estarían asociados con un mayor riesgo de mortalidad, y por lo tanto, predecirían la mortalidad de dichos sujetos estudiados. Además, como prueba de validación del IRP, se ha demostrado que los centenarios no cumplen ninguna de sus características (Strindhall *et al.*, 2007).

Sin embargo, dado que los factores que determinan el IRP son, posiblemente, multifactoriales, donde habría que incluir interacciones entre varios aspectos genéticos y ambientales, prácticamente desconocidos, hace que la inmunosenescencia sea una disciplina complicada de estudiar. Los niveles de citoquinas, los niveles de hormonas y la función de sus receptores, las defensas antioxidantes, la capacidad de reparación del ADN, el estado de acetilación de las histonas, la función del proteasoma, el control de la apoptosis, el metaboloma, los niveles de tipos celulares como las NKT o las células supresoras de CD4+CD25+, y los niveles de moléculas coestimuladoras positivas y negativas de linfocitos T, son todos, aspectos que se encuentran en el punto de mira de los inmunogerontólogos a la hora de poder definir el IRP o marcadores asociados a la longevidad (Pawelec *et al.*, 2002). Además se considera que este perfil de riesgo inmunitario podría estar asociado a una incapacidad de controlar la inflamación sistémica. De hecho, muchos investigadores han descrito una asociación entre niveles aumentados de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, con la mortalidad, niveles de expresión que tendrían una base genética (Franceschi *et al.*, 2000b; Caruso *et al.*, 2004). Bruunsgaard y colaboradores (2003a) demostraron que los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  servían como indicador de fragilidad en el individuo longevo, así como marcador pronóstico de mortalidad. Por lo tanto, la dificultad de la determinación de un perfil inmunitario desfavorable pasaría por conocer cuánto de estos cambios dependen de un *background* genético y cuánto de la historia natural del individuo, es decir, las sobrecargas antigénicas, como las infecciones crónicas, que haya padecido un

individuo a lo largo de su vida (Pawelec *et al.*, 2002), además de otras características de su estilo de vida.

Una serie de investigadores han aportado también hallazgos interesantes que refuerzan al sistema inmunitario, y concretamente a la desregulación de la red de citoquinas, como predictor de morbilidad y mortalidad. Van den Biggelaar y colaboradores (2004b) describieron que los participantes de 85 años de edad que tras una estimulación con LPS producían niveles bajos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , pero también de otras anti-inflamatorias, IL-1ra e IL-10, mostraban dos veces más riesgo de mortalidad en comparación con los sujetos que tenían mayores niveles de citoquinas pro- y/o anti-inflamatorias. Estos mismos autores encontraron una asociación genética con el promotor de IL-10, indicando que los individuos genéticamente predeterminados a producir bajos niveles de citoquinas, tanto pro- como anti-inflamatorias, tenían un mayor riesgo de perder la capacidad a responder apropiadamente a señales dañinas con el envejecimiento.

Recientemente se ha propuesto que los microARNs circulantes podrían ser marcadores biológicos del envejecimiento, ya que jugarían un papel importante regulando la longevidad (Noren Hooten *et al.*, 2013). Este hallazgo, cuya importancia reside en que podría representar una herramienta de diagnóstico poco invasivo, describe que tres tipos de microARNs disminuyen significativamente con la edad, de los cuales, uno regula la expresión de ARNm-s implicados en vías inflamatorias, y otro está negativamente correlacionado con las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$ , y positivamente correlacionado con las citoquinas anti-inflamatorias TGF- $\beta$  e IL-10.

Basado en el papel del sistema inmunitario como indicador de estado de salud y longevidad, los estudios realizados por nuestro grupo de investigación durante las últimas décadas han llevado a proponer algunas funciones inmunitarias no sólo como predictores de longevidad, sino también como marcadores de *edad biológica*, edad que, como ya se ha indicado, reflejaría con mayor detalle que la *cronológica* la velocidad a la que un individuo está envejeciendo (De la Fuente y Miquel, 2009). Dentro de estas funciones de las células inmunitarias se incluirían, en *linfocitos*, su capacidad para adherirse al endotelio vascular, migrar hacia el sitio de reconocimiento antigénico (quimiotaxis), proliferar en respuesta a mitógenos y la liberación de citoquinas como IL-2. En *fagocitos*, tanto neutrófilos como macrófagos, se incluirían las distintas etapas de su proceso fagocítico como la adherencia a



los tejidos, la quimiotaxis, la ingestión o fagocitosis de partículas extrañas y la destrucción de los patógenos por medio de la producción intracelular de radicales libres como  $O_2^-$  y otros ROS localizados en el fagosoma de estas células. Además, también se incluiría la capacidad de las células NK para destruir células tumorales. Todos estos parámetros, valorados en sujetos de distintas edades, de manera transversal en leucocitos de sangre periférica de humanos, y de manera longitudinal en leucocitos peritoneales de ratón, han mostrado cambios similares asociados a la edad en ambas especies (De la Fuente y Miquel, 2009).

La propuesta de identificar los parámetros arriba mencionados como marcadores de edad biológica y predictores de longevidad se encuentra avalada por dos aproximaciones experimentales 1) el desarrollo de un modelo de envejecimiento prematuro en ratón, en el cual dicho envejecimiento es detectado mediante una prueba comportamental, de manera que aquellos animales que la realizan peor, no sólo muestran un deterioro en la funcionalidad del sistema inmunitario y mayores niveles de estrés oxidativo, sino que viven menos que sus compañeros/homólogos del mismo género y edad cronológica (Guayerbas *et al.*, 2002a; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Viveros *et al.*, 2007; De la Fuente, 2008); y 2) el estudio de la funcionalidad inmunitaria y el estrés oxidativo en personas centenarias y en ratones que alcanzan una gran longevidad, todos los cuales presentan no sólo niveles de funcionalidad y estrés mejores que las personas de 65-75 años de edad o animales viejos, sino que dichos niveles son semejantes a los de los individuos adultos (Puerto *et al.*, 2005; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a; De la Fuente, 2014).

De esta forma se ha confirmado el papel central del sistema inmunitario no sólo en la salud y la longevidad, sino también como una herramienta para medir la edad biológica. Así, los individuos, tanto los seres humanos como los ratones, que muestren unos niveles de los parámetros arriba citados similares a individuos mayores, presentarán una mayor edad biológica y una menor longevidad. Y al contrario, aquellos que presenten niveles parecidos a sujetos más jóvenes, poseerán una menor edad biológica, y por lo tanto vivirán más. No obstante, conviene tener en cuenta que la valoración de un único parámetro inmunitario no permite determinar una buena o mala función inmunitaria, es el conjunto de distintas funciones lo que posibilita tal determinación.

### 1.1.8. El envejecimiento saludable o exitoso: Los individuos que alcanzan una gran longevidad

Los centenarios, el mejor modelo para estudiar la longevidad humana, se caracterizan por haber sobrevivido a enfermedades asociadas a la edad, responsables de la elevada morbilidad y mortalidad del envejecimiento, y de haber llegado al límite extremo de la vida en buenas condiciones clínicas (Cossarizza *et al.*, 1997). Así, estos individuos, no sólo escapan de las infecciones típicas de las personas mayores, sino que también muestran una resistencia peculiar contra el cáncer. Además, otras enfermedades como las cardiovasculares, la demencia, la diabetes y las cataratas, son menos comunes que en personas de 70-80 años de edad (Cossarizza *et al.*, 1997; Bonafè *et al.*, 2002; Moroni *et al.*, 2005; Galioto *et al.*, 2008).

Son muchos los estudios que demuestran una función inmunitaria relativamente intacta en un porcentaje alto de centenarios, tanto en su vertiente innata como en la adaptativa (Mocchegiani y Malavolta, 2004), lo que podría explicar porqué los centenarios son totalmente capaces de afrontar procesos infecciosos y por lo tanto, no presentan un aumento en la frecuencia de enfermedades infecciosas como ocurre en las personas mayores no longevas. Cabe destacar que cada vez son más los trabajos que demuestran esta preservación inmunitaria en personas nonagenarias, como se detallará a continuación.

A nivel de los **parámetros de función inmunitaria** presentados anteriormente, en el apartado de inmunosenescencia, la literatura indica, en general, una mayor *capacidad de adhesión* en los neutrófilos y los linfocitos de personas que alcanzan una elevada longevidad, ya que los nonagenarios y los centenarios presentan elevados niveles de ciertas moléculas de adhesión, como CD49d, CD11a, CD11b, CD18 o Mac-1 (CD11b/CD18), sobre la superficie de estas células (Cossarizza *et al.*, 1997; Ginaldi *et al.*, 1999; Moroni *et al.*, 2005; Franceschi *et al.*, 1995). Este hecho ha sido interpretado como un esfuerzo de las células inmunitarias para hacer frente a la disminuida capacidad de respuesta a un determinado estímulo con el envejecimiento, o para compensar la necesidad de un mayor requerimiento de señales de activación con la edad (Cossarizza *et al.*, 1997). Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, en función de la metodología empleada, la bibliografía muestra resultados contradictorios. En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, los neutrófilos de centenarios presentaron unos niveles menores de adherencia que sujetos de 65-75 años

y parecidos a personas adultas de 25-35 años de edad (Alonso-Fernández *et al.*, 2008). Por otro lado, los estudios sobre la capacidad de las células inmunitarias para responder a un estímulo quimiotáctico, promoviendo así su movilidad dirigida o *quimiotaxis*, también indican una actividad preservada de esta función en neutrófilos y en células mononucleares de los centenarios (Franceschi *et al.*, 1995; 1996; Alonso-Fernández *et al.*, 2008). Además, los linfocitos T periféricos procedentes de centenarios no sólo alcanzan sin dificultad la zona de inflamación, sino que muestran una *capacidad proliferativa* preservada tras un estímulo apropiado (Franceschi *et al.*, 1995; 1996). Sin embargo, no se ha encontrado ningún estudio referente al estado de estas dos últimas funciones en individuos nonagenarios.

En cuanto a otras funciones de la inmunidad innata en personas que alcanzan una gran longevidad, concretamente en la *función fagocítica*, se ha descrito que los neutrófilos de centenarios la presentan mejor, o mayor en términos de niveles, que las personas de 42-64 y 65-75 años de edad (Miyaji *et al.*, 2000; Alonso-Fernández *et al.*, 2008). En sujetos nonagenarios, se ha encontrado una menor producción de ROS que en individuos de 61-85 años de edad (Moroni *et al.*, 2005). Además, en estos últimos individuos se ha observado un ligero aumento de la apoptosis de neutrófilos tras haber ingerido microorganismos, evitando así la inflamación crónica característica de sujetos mayores no longevos, cuyos neutrófilos son menos propensos a experimentar apoptosis tras realizar su función (Moroni *et al.*, 2005). Por otra parte, las células NK de los centenarios son capaces de eliminar células diana tan eficazmente como las de los jóvenes, gracias a la preservación de su *actividad citotóxica* (Cossarizza *et al.*, 1997). A su vez, en nonagenarios se ha comprobado que estas células mantienen la capacidad de sintetizar IL-8 y otras quimioquinas, y no pierden la de responder a IL-2 e IL-12 (Mariani *et al.*, 2002), lo que favorecería el mantenimiento de las funciones arriba mencionadas. Dado que la actividad citotóxica de las células NK ha sido postulada como predictor de morbilidad y mortalidad (Levy *et al.*, 1991), la ausencia de variación en los niveles de esta función con la edad, y concretamente en edades muy avanzadas, podría considerarse como sinónimo de buena salud, y por lo tanto, predictor de una longevidad exitosa (Ginaldi *et al.*, 1999).

Todos estos hallazgos sugieren que las personas que han sobrevivido hasta alcanzar una elevada edad poseen unos mecanismos inmunitarios preservados y eficaces, capaces de prevenir patologías y alargar la vida. Sin embargo, a pesar de que en las últimas décadas se

ha observado un aumento en el número de personas que rondan los 100 años de edad, se podría considerar que son pocos los afortunados en alcanzar esa gran longevidad, desde el punto de vista demográfico (Franceschi y Bonafè, 2003). Esto nos lleva a plantear la pregunta de por qué unos alcanzan una elevada longevidad y otros no. Son muchos los inmunogerontólogos que opinan que el éxito reside en la combinación óptima entre un estilo de vida apropiado y el *background* genético de cada persona (Cossarizza *et al.*, 1997). De hecho, los centenarios se han caracterizado por poseer una mayor frecuencia de marcadores genéticos asociados a un mejor control de la inflamación (Vasto *et al.*, 2009). Así, la posesión de ciertos genotipos asociados a una alta producción de citoquinas anti-inflamatorias, como IL-10, y una baja de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, aumentaría la posibilidad de alcanzar el límite extremo de la esperanza de vida. Sin embargo, este hecho sólo ha sido observado en hombres centenarios, lo que apuntaría a que el género es una variable importante a tener en cuenta en la longevidad, ya que los hombres y las mujeres podrían estar sujetos a distintas estrategias para alcanzarla (Lio *et al.*, 2002; 2003; Caruso *et al.*, 2004; Franceschi *et al.*, 2007).

A pesar de lo indicado, y lejos de lo que cabría esperar, los centenarios poseen grandes cantidades de **citoquinas pro-inflamatorias** y marcadores inflamatorios (Gerli *et al.*, 2000), y por lo tanto, estos individuos de una longevidad excepcional también estarían afectados por el “inflamm-aging”. Así, en estudios que abarcan un amplio rango de edades, desde la década de los 20 hasta la centena, se ha observado un aumento exponencial de IL-6 con la edad, donde tanto los nonagenarios como los centenarios poseerían los mayores niveles de esta citoquina (Bruunsgaard *et al.*, 1999a; Giuliani *et al.*, 2001; Forsey *et al.*, 2003; Ferrucci *et al.*, 2005; Moroni *et al.*, 2005). En estos sujetos también se encuentran elevados los niveles de TNF- $\alpha$  y PCR (Bruunsgaard *et al.*, 1999a; Sandmand *et al.*, 2003; Ferrucci *et al.*, 2005). Además, en los sobrenadantes de cultivo de células mononucleares tras haber sido estimuladas, se observan unos niveles muy elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en personas centenarias (Cossarizza *et al.*, 1997). Cabe destacar, que en cultivos de granulocitos purificados, donde la mayoría de las células son neutrófilos, las células que más IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  producen tras un estímulo son aquellas que proceden de centenarios sanos (no toman medicinas ni requieren cuidados especiales), mientras que el grupo de individuos de 42-64 años y los centenarios no sanos, que se caracterizan por ser dependientes y necesitar

cuidados diarios, producen niveles parecidos de estas citoquinas (Miyaji *et al.*, 2000). Estos hechos han llevado a plantear la posibilidad del papel beneficioso de las citoquinas pro-inflamatorias en edades muy avanzadas.

Por otra parte, el papel indispensable de las **citoquinas y los mediadores anti-inflamatorios** en la extrema longevidad es indiscutible, ya que el envejecimiento exitoso o saludable requeriría mecanismos anti-inflamatorios para contrarrestar la acción de los mediadores pro-inflamatorios arriba citados (Franceschi *et al.*, 2007), compensando probablemente así la respuesta inmunitaria adversa del “inflamm-aging” (Giunta *et al.*, 2008). De hecho, unos niveles plasmáticos elevados de TGF- $\beta$ , aunque no de IL-10, en nonagenarios (Forsey *et al.*, 2003), y de sTNF-RI y -RII en centenarios, niveles que incluso serían mayores que en personas de 66-80 años (Gerli *et al.*, 2000), serían parte de las eficientes redes anti-inflamatorias que se han descrito en los individuos longevos, y que faltarían o fallarían por ser insuficientes en el envejecimiento “normal” (Franceschi *et al.*, 2007).

Como ya se ha comentado anteriormente, son muchas las evidencias que apuntan al **estrés oxidativo** como el principal responsable del deterioro del sistema inmunitario y del organismo en general, definido por un aumento de factores prooxidantes y disminución de defensas antioxidantes (Daynes *et al.*, 2003; De la Fuente y Miquel, 2009; Salminen y Kaarniranta, 2010). Sin embargo, los centenarios se caracterizan por un bajo grado de estrés oxidativo. Son varios los trabajos que indican un menor daño oxidativo a lípidos, como por ejemplo niveles bajos de malondihaldeído (MDA), y mayores de compuestos y enzimas antioxidantes, como niveles altos de glutatión total, de la relación GSH/GSSG, de las vitaminas A, C y E plasmáticas y de la actividad de la catalasa, en centenarios cuando son comparados con sujetos mayores pero de menor edad que ellos. La presencia de esos niveles más bajos de oxidantes y más elevados de antioxidantes en los centenarios, opuestos a los típicos del envejecimiento en donde se encuentran justo al contrario (Paolisso *et al.*, 1998; Mecocci *et al.*, 2000; Barbieri *et al.*, 2003; Alonso-Fernández *et al.*, 2008), conferiría una mayor resistencia al estrés oxidativo en individuos centenarios. Sin embargo, apenas se han encontrado trabajos en relación al estado oxidativo en personas nonagenarias, si bien cabe destacar el artículo de Kaszubowska y colaboradores (2011) donde exponen que el

estado antioxidante sérico de personas nonagenarias es similar a la de jóvenes de 26 años de edad media.

Así, las personas que alcanzan una elevada longevidad serían el mejor ejemplo de que las desregulaciones asociadas a la edad en las funciones inmunitarias pueden ser compensadas por la continua adaptación del cuerpo a las alteraciones que se producen con el paso del tiempo (Mocchegiani y Malavolta, 2004).

#### **1.1.9. La comunicación neuroinmunoendocrina y su modificación en el envejecimiento**

Los sistemas reguladores que controlan la homeostasis del organismo, el nervioso, el endocrino y el inmunitario, no trabajan aisladamente, sino que existe una estrecha comunicación entre ellos. Actualmente, son muchos los trabajos que confirman una comunicación bidireccional entre estos sistemas, a través de neurotransmisores, hormonas y citoquinas, que coexisten en los tejidos nerviosos, endocrinos y linfoides, y cuyos receptores se encuentran presentes en las células de los tres sistemas. Por lo tanto, cualquier influencia sobre el sistema inmunitario, ejercerá un efecto sobre los sistemas nervioso y endocrino, y *viceversa* (Besedovsky y Del Rey, 1996). Esta compleja red de regulación ha dado lugar a la aceptación del término “sistema neuroinmunoendocrino”, responsable de la preservación de la homeostasis, y consecuentemente, de la salud (Besedovsky y Del Rey, 2007).

Al igual que el sistema neuroendocrino es un receptor de estímulos cognitivos, como la luz, el sonido, las situaciones de estrés, etc., a los cuales responde liberando mediadores, neurotransmisores y hormonas, que alcanzan el sistema inmunitario para informar sobre la situación, el sistema inmunitario representa un sistema de recepción de estímulos no-cognitivos que aparecen en el organismo. El sistema inmunitario responde a estos estímulos, infecciones, células tumorales u otros tipos de células extrañas, y transfiere la información por medio de las citoquinas que produce al sistema neuroendocrino (Blalock, 1984). Un claro resultado del sistema neuroinmunoendocrino son los ritmos biológicos, cuyos mecanismos se introducirán en el siguiente apartado.

La confirmación científica de esta comunicación ha permitido comprender por qué las situaciones de depresión, el estrés emocional o la ansiedad, pueden provocar una mayor susceptibilidad a infecciones, cánceres o enfermedades autoinmunes. Esta mayor

susceptibilidad supone la existencia de una alteración del sistema inmunitario, lo que resultaría en una peor salud y una menor longevidad. Por el contrario, situaciones agradables o una visión optimista de la vida, ayudaría al mantenimiento de una buena función inmunológica (Barak, 2006; Arranz *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2009; Costa-Pinto y Palermo-Neto, 2010; Cruces *et al.*, 2014b). Y a la inversa, los cambios en el sistema inmunitario, como los que tiene lugar en un proceso infeccioso, alteran las funciones del sistema nervioso dando lugar al *sickness behaviour*, trastornos conductuales que sufren las personas enfermas (Dantzer, 2001).

Con la edad, los propios sistemas reguladores y la comunicación que se establece entre ellos, se alteran, llevando a una pérdida de la homeostasis y de la resistencia al estrés (Straub *et al.*, 2001; Mate *et al.*, 2014b; Cruces *et al.*, 2014a). Así, los cambios en la comunicación entre los sistemas nervioso e inmunitario son probablemente la causa de la senescencia fisiológica (Fabris, 1990). Además, el deterioro del sistema inmunitario con el envejecimiento podría afectar las funciones de los otros sistemas reguladores a través del aumento del estrés oxidativo e inflamatorio, resultando en una alteración de la homeostasis asociada a la edad y en el aumento de la morbilidad y mortalidad (Mate *et al.*, 2014b; Cruces *et al.*, 2014a; De la Fuente, 2014). Sin embargo, es difícil determinar si, con el envejecimiento, los cambios neurológicos inducen cambios inmunológicos o si las alteraciones del sistema inmunitario inducen cambios en el sistema nervioso, o si bien, ambos procesos ocurren simultáneamente, lo que parece ser más probable según algunos autores (Bellinger *et al.*, 2001).

No hay que olvidar que debido a la producción de las hormonas sexuales por parte del sistema endocrino, la compleja red de interacciones neuro-inmuno-endocrinas diferirá entre hombres y mujeres, siendo así el factor *género* un contribuyente clave en el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Bale, 2009; Pitychoutis y Papadopoulou-Daifoti, 2010). De hecho, las diferencias asociadas al género que se aprecian en el sistema inmunitario, en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), o en el sistema nervioso central y periférico, serían el resultado, en una gran parte, de la influencia de los esteroides sexuales a lo largo de la ontogenia del ser humano (Gaillard y Spinedi, 1998; Morale *et al.*, 2001; Leposavić *et al.*, 2009; Chrousos, 2010; Schwarz y Bilbo, 2012; Mulak *et al.*, 2014). Así, el dimorfismo sexual de los sistemas reguladores, y por consecuencia, del sistema neuroinmunoendocrino en

general, tendrían como base la influencia de las hormonas sexuales, razón por la que se encuentran descritas numerosas enfermedades que afectan diferencialmente a hombres y mujeres en términos de incidencia, susceptibilidad y progresión, como las enfermedades autoinmunes, la depresión o la enfermedad de Alzheimer (Gaillard y Spinedi, 1998; O'Brien *et al.*, 2007; Butts y Sternberg, 2008; Giménez-Llort *et al.*, 2012).

En lo que respecta al sistema inmunitario, son múltiples los efectos moduladores de las hormonas sexuales sobre las células inmunitarias. En términos generales, los estrógenos potencian la inmunidad humoral, mientras que los andrógenos y la progesterona actúan como inmunosupresores naturales. Además, el estradiol inhibe la expresión génica y la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la activación del NF- $\kappa$ B (Kim *et al.*, 2012). Cabe destacar que en función del momento del ciclo menstrual la funcionalidad del sistema inmunitario varía, como se ha demostrado en los niveles de diversas citoquinas (O'Brien *et al.*, 2007; Dennison *et al.*, 2012). Con la menopausia, sin embargo, los efectos beneficiosos derivados de los estrógenos sobre la función inmunitaria desaparecen, lo que supone un deterioro de la inmunidad. Este efecto debido a la pérdida de estrógenos ha sido observado en muchos estudios en mujeres menopáusicas (Arranz *et al.*, 2008) y en animales de experimentación (ratas y ratones) ovariectomizadas (Baeza *et al.*, 2010; 2011). Con la menopausia, además aumentan toda una serie de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, lo que implica una conexión molecular entre la pérdida de los esteroides sexuales y la inmunosenescencia. Así, la mayoría de estudios existentes concluyen que la menopausia posee un papel adicional al envejecimiento del sistema inmunitario, aunque todavía nos encontramos lejos de comprender a fondo las vías moleculares que conectan las hormonas sexuales y la menopausia con la inmunosenescencia (Vrachnis *et al.*, 2014).



## **1.2. LA CRONOBIOLOGÍA**

### **1.2.1. Los ritmos biológicos**

La cronobiología es una rama de la biología que estudia las variaciones periódicas que ocurren en los organismos, variaciones conocidas como ritmos biológicos. Estos, son cambios regulares que tienen lugar en un periodo de tiempo determinado sobre una infinidad de variables biológicas.

Los ritmos biológicos suelen clasificarse en función de su periodo, es decir, de la frecuencia con que se repite cada ciclo. Así, podemos diferenciar diversos ritmos conocidos como: a) ultradianos, los cuales poseen un periodo inferior a 20 h; b) circadianos, aquellos que duran unas 24 h (de 20 a 28 h) y se encuentran sincronizados con el ciclo día/noche; y c) los ritmos infradianos, con un periodo superior a 28 h. Esta última categoría incluye una gran variedad de ritmicidades, como por ejemplo los ciclos estrales y menstruales, y los ritmos circanuales o estacionales, de un periodo de unos 12 meses (Halberg, 1969). Estos ritmos biológicos proporcionan al organismo la capacidad de anticiparse y adaptarse a los cambios periódicos que ocurren en el ambiente y a los producidos por cambios fisiológicos intrínsecos que tienen lugar de manera regular. Además, permiten mantener un orden temporal interno entre diversas funciones relacionadas, programando de manera eficiente las funciones fisiológicas de las células y de los organismos en general, y así optimizar su supervivencia (Golombek y Rosenstein, 2010).

Prácticamente todos los parámetros neurológicos, endocrinos e inmunológicos de los mamíferos poseen una periodicidad biológica, mostrando una estructura temporal intrincada con variaciones rítmicas y pulsátiles de múltiples frecuencias (Haus, 2007). Así, estas oscilaciones periódicas pueden ser observadas en casi todos los niveles de organización, desde el conductual hasta el molecular.

Tal y como se ha comentado en el anterior apartado, existe una estrecha comunicación entre los tres principales sistemas reguladores, el nervioso, el endocrino y el inmunológico. Las complejas interacciones entre estos sistemas generan una compleja red neuroinmunoendocrina, que permite la preservación de la homeostasis y consecuentemente de la salud (Besedovsky y Del Rey, 1996; 2007; Wrona, 2006; De la Fuente y Miquel, 2009; De la Fuente, 2014). Los ritmos biológicos forman un claro ejemplo de esta comunicación,

dado que gracias al ciclo luz/oscuridad, principal sincronizador temporal de la mayoría de los seres vivos, la información sobre el momento del día se traduce desde el cerebro al resto del cuerpo, tal y como se detallará más adelante, confiriendo una estructura temporal adecuada para todas las funciones del organismo.

### 1.2.1.1. Los ritmos circadianos

Los ritmos circadianos (del latín *circa*, que significa “alrededor de” y *dies*, que significa “día”) son oscilaciones de las variables biológicas en intervalos regulares de 20-28 h de tiempo. Las funciones fisiológicas y conductuales de todos los mamíferos, incluyendo los humanos, presentan una ritmicidad circadiana ya que se ajustan a un periodo de unas 24 h, como por ejemplo el ciclo sueño/vigilia, la temperatura corporal, el metabolismo, o la cognición (Gachon *et al.*, 2004). La secreción y los niveles circulantes de prácticamente todos los mediadores de los tres sistemas reguladores, los neurotransmisores, las hormonas, y las citoquinas, así como los niveles de sus receptores también muestran ritmos circadianos (Esquifino *et al.*, 2007).

¿Cómo consigue el organismo sincronizar todas estas funciones a los ciclos geofísicos generados de la rotación de la Tierra alrededor de su eje? El principal marcapasos circadiano responsable de orquestar los ritmos biológicos de los mamíferos es el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Ralph *et al.*, 1990). A través de las inervaciones del tracto retinohipotalámico, la luz, principalmente la que proviene del sol, activa el NSQ, núcleo que se encarga de recibir, procesar y enviar la información lumínica al resto del cuerpo (Meijer y Schwartz, 2003) (Fig. 5). Esta sincronización se realiza gracias a un pequeño número de células ganglionares de la retina que contienen melanopsina y que se proyectan directamente al NSQ sin necesidad de la señalización fótica convencional a través de los conos y bastones (Hattar *et al.*, 2002). Las neuronas del NSQ contactan con un amplio rango de regiones cerebrales, como el núcleo paraventricular (NPV), uno de los núcleos hipotalámicos más importantes para el control circadiano. Así, las neuronas pertenecientes al sistema nervioso autónomo del NPV transportan la señal circadiana a través de múltiples conexiones sinápticas hasta las neuronas preganglionares simpáticas de la médula espinal. Éstas, tras las sinapsis en sus correspondientes ganglios, se comunican con las vísceras periféricas, además de con los órganos de los sistemas endocrino e inmunológico (Buijs y

Kalsbeek, 2001). Por lo tanto, los nervios del sistema nervioso autónomo (SNA) constituyen eficientes autopistas para dirigir la información sobre el momento del día a los tejidos periféricos como el de la glándula adrenal, el páncreas, el hígado, los ovarios, los nódulos linfáticos y muchos otros órganos más (Buijs *et al.*, 2003). Estas neuronas del SNA que se localizan en el NPV también se encuentran implicadas en la secreción de la melatonina desde la glándula pineal al torrente sanguíneo. Esta hormona, que será mencionada a lo largo de todos los apartados correspondientes a esta sección de cronobiología, se considera el sincronizador interno o la molécula cronobiótica más importante del organismo (Teclemariam-Mesbah *et al.*, 1999; Pandi-Perumal *et al.*, 2006). Además, el NSQ contacta con el núcleo dorsomedial del hipotálamo, contribuyendo al control circadiano del sistema orexin/hipocretina, cimentando así el ciclo sueño/vigilia (Abrahamson *et al.*, 2001). Otra vía de salida de la señal circadiana surge de la inervación del NSQ a las neuronas CRH del NPV. Estas neuronas, a su vez, confieren una ritmicidad a la liberación de ACTH por la pituitaria, y consecuentemente una secreción circadiana de corticosterona de las glándulas adrenales, conformando el eje HHA (Buijs *et al.*, 2003). Por lo tanto, la señalización circadiana se proyecta desde el NSQ del hipotálamo al resto del cuerpo a través del SNA y el sistema neuroendocrino, por vías eferentes nerviosas y señales humores, respectivamente, modulando respuestas conductuales y funciones fisiológicas, incluyendo la funcionalidad leucocitaria (Arjona y Sarkar, 2008).

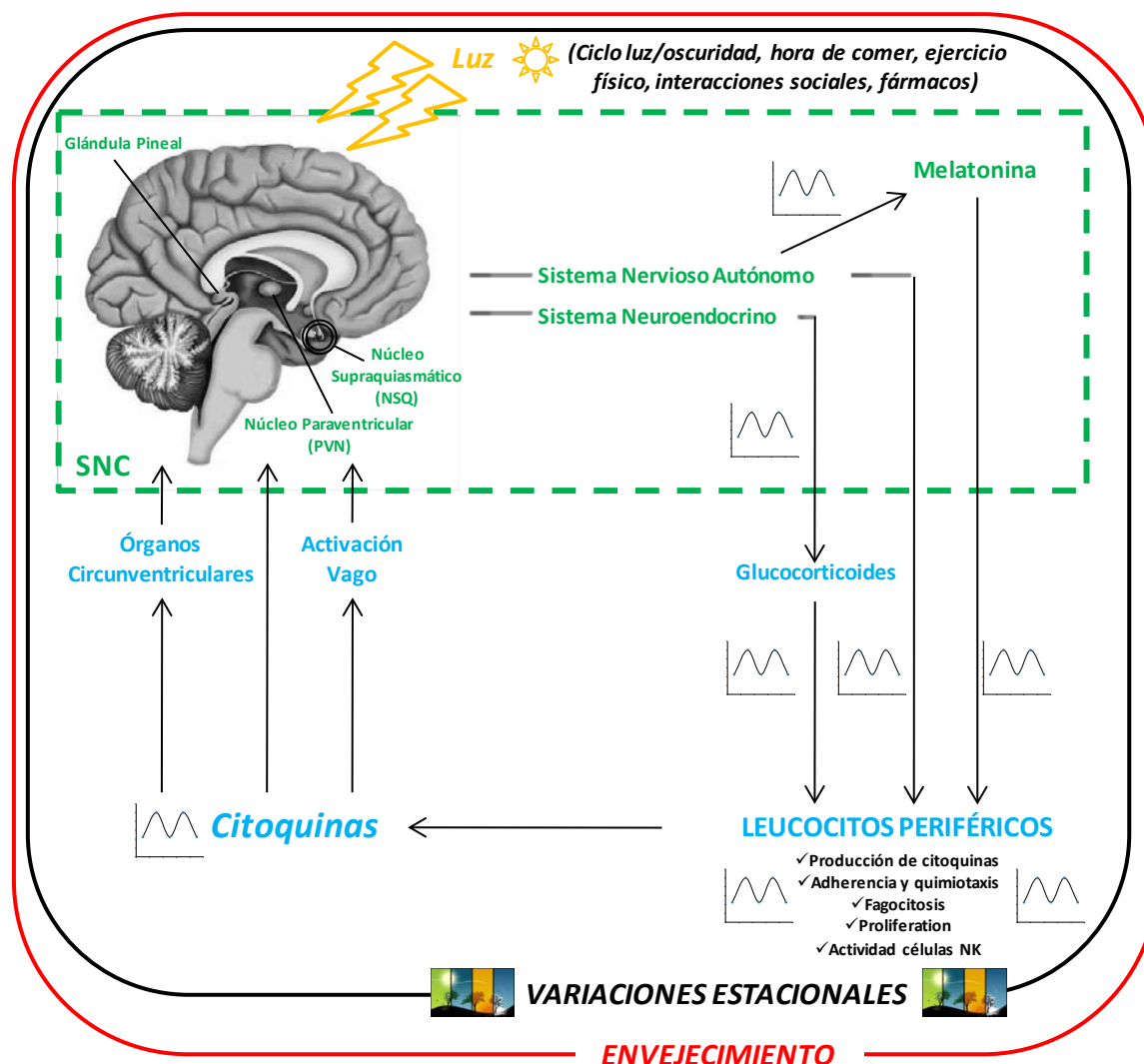
Tal y como se ha comentado, bajo condiciones ambientales naturales, los ritmos se sincronizan al ciclo de 24 h, principalmente, por la alternancia entre luz y oscuridad todos los días. Existen otros indicadores externos, además de la luz, que pueden actuar también como sincronizadores, como la hora de comer, las actividades programadas como el ejercicio físico y las interacciones sociales cotidianas (Klerman *et al.*, 1998; Stokkan *et al.*, 2001; Scheibler y Wollnik, 2009). Sin embargo, bajo condiciones constantes (luz u oscuridad permanente o temperatura constante), los ritmos circadianos pueden persistir, lo que indica que poseen un carácter endógeno mediado por osciladores autónomos “automantenidos” (en inglés, *self-sustained*) (Yoo *et al.*, 2004). La actividad periódica de estos osciladores o relojes periféricos es el resultado de una maquinaria molecular basada en genes muy conservados en la evolución llamados genes reloj, que muestran un patrón de expresión circadiano tanto en las neuronas del NSQ como en el resto de las células del organismo, incluyendo las células

inmunitarias (Reppert y Weaver, 2002; Boivin *et al.*, 2003; Lowrey y Takahashi, 2004; Kusanagi *et al.*, 2004). Así, dependiendo del tejido, el 10-15 % de todos los genes oscilan de manera diaria gracias a este reloj molecular (Ptitsyn *et al.*, 2007), y cada célula mostraría su propio programa circadiano, específico de cada tejido. Por ejemplo, la expresión circadiana de ciertos componentes de la inmunidad innata en el intestino delgado, como los TLRs, las defensinas y las proteínas NOD, se sincroniza con la hora de comer, ya que confieren protección contra los patógenos (Froy y Chapnik, 2007). A su vez, se ha visto que la liberación intrínseca de ciertas citoquinas actúa como sincronizador para las células inmunitarias, ya que la IL-6, por ejemplo, induce la expresión de genes reloj (Motzkus *et al.*, 2002). Sin embargo, todas estas expresiones circadianas “automantenidas” se pierden en animales con el NSQ lesionado (Akhtar *et al.*, 2002), lo que indica que los osciladores o relojes periféricos se encuentran regulados por el NSQ, generando un ritmo fisiológico coherente, y asegurando, así, una óptima estructura temporal de las funciones del organismo (Sujino *et al.*, 2003; Teboul *et al.*, 2008). Todo el conjunto de estructuras implicadas en la generación y en la sincronización de los ritmos circadianos al ambiente se le conoce como **sistema circadiano**.

Esta estructura temporal biológica tiene una profunda influencia sobre el sistema inmunológico. Se ha demostrado una ritmicidad circadiana en muchas funciones inmunológicas, como en el número y/o porcentaje de prácticamente todos los tipos y subpoblaciones de leucocitos circulantes (Ritchie *et al.*, 1983; Miyawaki *et al.*, 1984; Lévi *et al.*, 1988b; Kronfol *et al.*, 1997), en la proliferación de linfocitos tanto en condiciones basales como en presencia de PHA (Tavadia *et al.*, 1975; Eskola *et al.*, 1976), en varias funciones que forman parte del proceso fagocítico como la quimiotaxis, la fagocitosis y la producción de anión superóxido (Melchart *et al.*, 1992; Berger y Slapnicková, 2003; Roy *et al.*, 2008; Kaplan *et al.*, 2008), así como en la expresión de moléculas de adhesión de las membranas de los leucocitos (Maple *et al.*, 1998; Niehaus *et al.*, 2002). La respuesta celular inmunológica frente a la exposición de antígenos (Lévi *et al.*, 1991) así como la actividad citotóxica de las células NK (Gatti *et al.*, 1987; McGlone *et al.*, 1991; Kronfol *et al.*, 1997) también muestran un ritmo circadiano. Además, se han observado patrones circadianos en los niveles de las citoquinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Young *et al.*, 1995; Sothorn *et al.*, 1995;

Ertzian *et al.*, 1996; Petrovsky, 2005). Por lo tanto, tanto la inmunidad innata como la adquirida oscilan de una manera rítmica.

Por otro lado, dados los efectos de las hormonas neuroendocrinas sobre el sistema inmunológico, y que estos inmunomoduladores, como son, por ejemplo, el cortisol, la melatonina y las catecolaminas, muestran variaciones circadianas, las numerosas acciones que ejercen sobre diferentes dianas del sistema inmunológico, también presentan dicha ritmicidad. El cortisol, la principal hormona que media las respuestas al estrés y que presenta un pico máximo a primera hora de la mañana, ejerce un efecto linfopénico sobre los linfocitos, tanto en su número total como en el de las distintas subpoblaciones (Miyawaki *et al.*, 1984; Kronfol *et al.*, 1997; Dimitrov *et al.*, 2009). A su vez, los niveles plasmáticos de cortisol muestran una correlación negativa con la respuesta proliferativa a PHA (Eskola *et al.*, 1976), y una correlación positiva con el porcentaje y la actividad de las células NK (Gatti *et al.*, 1987; Kronfol *et al.*, 1997). Además, esta hormona inhibe, en mayor medida, la producción de citoquinas Th1 que incluye citoquinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-12, que las Th2, que engloba citoquinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 (Petrovsky y Harrison, 1995; 1998; Petrovsky *et al.*, 1998). La hormona “nocturna” melatonina, que muestra unas concentraciones mayores en sangre durante la noche pero es casi indetectable durante el día (Mishima *et al.*, 2001), además de sincronizar los ritmos circadianos de los osciladores periféricos (de ahí que se le denomine molécula cronobiótica), ejerce una regulación negativa sobre la actividad fagocítica (Roy *et al.*, 2008), y modula la secreción de citoquinas Th1 como, IL-2, IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Lissoni *et al.*, 1998; Srinivasan *et al.*, 2008). Por su parte, las catecolaminas, como la epinefrina, están involucradas en la proliferación linfocitaria (Cardinali *et al.*, 1996) y en la regulación circadiana de las subpoblaciones de linfocitos T, observando una correlación positiva entre el ritmo de la epinefrina y los niveles de linfocitos CD8+ (Dimitrov *et al.*, 2009).



**Figura 5. Ilustración esquemática de la comunicación bidireccional entre el sistema circadiano y el sistema inmunitario.** La señal circadiana del NSQ transmitida vía sistema nervioso autónomo y neuroendocrino, que incluye la secreción de la melatonina, actuará sobre varias funciones inmunitarias como la adherencia y la quimiotaxis de leucocitos, la fagocitosis, la proliferación, la actividad de las células NK, así como sobre los niveles de citoquinas producidas por leucocitos activados, que a su vez se han caracterizado por poseer un ritmo endógeno. Las citoquinas liberadas por las células inmunitarias periféricas pueden llegar al sistema nervioso central (SNC) incluyendo el NSQ a través de la vía sanguínea y la activación del vago. Se ha postulado que todo este sistema se altera con las variaciones estacionales y el envejecimiento.

Además de toda esta red de complejas interacciones, cabe destacar **la influencia que el sistema inmunitario periférico** puede ejercer sobre el cerebro, y más concretamente sobre el NSQ y por ende **sobre los ritmos circadianos** (Fig. 5). Las crecientes pruebas sobre la existencia de una regulación inmunológica del reloj circadiano han llevado a la propuesta de una comunicación bidireccional entre los sistemas circadiano e inmunitario (Coogan y Wyse, 2008). La certeza de que la programación circadiana está bajo la influencia del sistema inmunitario surge de un proceso llamado *sickness behaviour* o "conducta del enfermo". Este

fenómeno es un conjunto de cambios conductuales que desarrollan los individuos enfermos durante el curso de una infección (Hart, 1988). Las alteraciones fisiológicas y conductuales que caracterizan el *sickness behaviour* durante la fase aguda de la respuesta inmunológica (letargo, debilidad, languidez, apatía, disminución de la ingesta, patrones alterados de sueño y tendencia depresiva) poseen un componente circadiano (Wirz-Justice, 2006). Son muchas y muy consistentes las pruebas que destacan el papel principal de las citoquinas pro-inflamatorias, producidas por los leucocitos periféricos activados, a la hora de inducir este proceso (Pollmächer *et al.*, 2002). Las citoquinas transmiten mensajes desde la periferia al cerebro utilizando tanto la vía sanguínea como la nerviosa (Johnson, 2002). La barrera hematoencefálica (BHE), que engloba al sistema nervioso central (SNC), regula el paso de proteínas de diversa etiología desde la periferia al cerebro y *viceversa* por difusión simple o por sistemas de transporte saturable (Kastin *et al.*, 1999). Los órganos circunventriculares, caracterizados por una extensa vasculatura y una ausencia de BHE "normal", permiten la conexión entre el SNC y el flujo sanguíneo periférico (Dantzer, 2001). Así, los mediadores inflamatorios producidos a nivel sistémico cruzan la BHE y actúan sobre sus receptores específicos expresados en las células neuronales y gliales del cerebro, incluyendo el NSQ. De este modo estimulan la producción central de citoquinas, las cuales a su vez actuarían en el NSQ, el cual tiene una amplia distribución de receptores de citoquinas (Pollmächer *et al.*, 2002; Coogan y Wyse, 2008). De hecho, existen datos que indican que un aumento de las citoquinas periféricas pueden provocar una elevación de los niveles cerebrales de las mismas (Dantzer, 2001). Además, la activación de los nervios aferentes primarios que inervan la zona de inflamación periférica constituye otra vía de transmisión rápida a través del vago (Dantzer, 2001). Así, se ha demostrado que las citoquinas periféricas pueden modular el sistema circadiano a un nivel conductual y molecular. Por ejemplo, la administración de IFN- $\alpha$  perturba los ritmos de la actividad locomotora, la temperatura corporal y la expresión de genes reloj, tanto de los osciladores periféricos como del NSQ (Ohdo *et al.*, 2001). La administración peritoneal de LPS induce la expresión de c-FOS en el NSQ, sugiriendo que la activación inmunitaria mediada por LPS podría considerarse como un sincronizador del reloj circadiano (Marpegán *et al.*, 2005). Hay que mencionar el papel de la glía del NSQ, dado que puede mediar las señales entrantes de la activación del sistema inmunitario y que llegan al sistema circadiano vía NF- $\kappa$ B (Leone *et al.*, 2006). Por lo tanto, la activación periférica de las células inmunitarias tendrá como resultado cambios en las funciones cerebrales, un efecto

que puede ser observado incluso en ausencia de una enfermedad concreta (Besedovsky y Del Rey, 2011).

La importancia del conocimiento del sistema circadiano radica en que un buen mantenimiento y estructura de su reloj promoverá una mejor funcionalidad de los sistemas fisiológicos, un mayor bienestar y un aumento de la esperanza de vida, mientras que la alteración de los ritmos estará asociado con un envejecimiento prematuro y una menor expectativa de vida (Froy, 2011).

Son muchos los ejemplos del impacto de las perturbaciones de los ritmos sobre la salud; los trabajadores nocturnos y los que trabajan en turnos rotativos, o las personas que sufren de *jet lag* muestran diversas alteraciones inmunitarias y un aumento del riesgo a padecer cáncer (Kiessling *et al.*, 2010). De la misma forma, la exposición a la luz durante la noche ha sido relacionado con el desarrollo de cáncer (Blask *et al.*, 2011). Debido al papel regulador de la melatonina sobre el sistema circadiano y el sueño, y promover un mejor funcionamiento del sistema inmunitario, se ha comprobado que la supresión de esta hormona, provocada por perturbaciones en el sueño o por la luz durante la noche, conlleva una inmunodepresión y un mayor riesgo de desarrollar distintos tipos de cáncer (Blask, 2009). En lo que respecta a la alteración circadiana de los glucocorticoides, la misma provoca una supresión de la funcionalidad de los leucocitos y una sobreactivación de la respuesta inflamatoria, promoviendo el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis (Eismann *et al.*, 2010). Otra razón por la cual es relevante el conocimiento de las variaciones circadianas, es porque las alteraciones en los niveles fisiológicos de los componentes de los sistemas reguladores, así como, concretamente, en el número y en la funcionalidad de las células inmunitarias de sangre periférica, podrían indicar la existencia de una enfermedad y el estadio en la que la misma se encuentra (Mazzocchi *et al.*, 1999), lo que sería importante en los diagnósticos clínicos. Es más, el conocimiento de los patrones rítmicos podrían advertirnos sobre el momento en el que un fármaco es más o menos efectivo (Lévi *et al.*, 1991).



### 1.2.1.2. Los ritmos circanuales o las variaciones estacionales

Los mamíferos que viven en áreas no tropicales experimentan largos periodos de fluctuaciones estacionales en el clima, la predación, la disponibilidad de los alimentos y la demanda energética (Demas y Nelson, 1996). Estos retos ambientales son recurrentes y por lo tanto predecibles, por lo que cada año, los seres vivos deben ser capaces de anticiparse a los diversos estresores ambientales, con el fin de enfrentar y superar aquellas condiciones que pudieran amenazar su salud y vida. En muchas especies animales existen patrones estacionales de morbilidad y mortalidad, lo que indicaría la existencia de un proceso adaptativo frente a los “desafíos inmunológicos”, con el objetivo de mejorar la supervivencia y aumentar el *fitness* de los organismos (Nelson *et al.*, 1995). Por el contrario, la incapacidad de enfrentarse o superar las condiciones adversas, como las que tienen lugar en el invierno (baja disponibilidad de comida y una alta necesidad de energía para la termorregulación), aumentaría la prevalencia de enfermedades y de la mortalidad (Demas y Nelson, 1996).

El aislamiento del ser humano por el desarrollo de viviendas y la realización de sus actividades diarias “protegido” del medio externo, es decir, de la luz solar y de la temperatura, además del uso de la calefacción y del aire acondicionado, ha llevado a pensar que la biología humana funciona de manera independiente a los ritmos circanuales. Sin embargo, en los países industrializados, a pesar de las mejoras en las condiciones de vida y poseer una nutrición de alta calidad, las estaciones todavía parecen tener un gran impacto sobre muchos aspectos de la fisiología y de la salud (Foster y Roenneberg, 2008). Por ejemplo, son muchos los estudios que han observado la existencia de ritmos circanuales en diversos parámetros bioquímicos y hematológicos valorados en pruebas rutinarias (Nicolau y Haus, 1989; Cheung *et al.*, 2002; Yanai *et al.*, 2008). En función del área geográfica, se ha descrito una estrecha correlación de la duración del día (fotoperiodo), la media mensual de horas diarias de luz solar, la temperatura mínima y máxima y la humedad, con la tasa de concepción; a mayor latitud, donde los cambios en la duración del día son muy pronunciados, se ha observado un aumento de las concepciones que coincide con el equinoccio (del latín *aequinoctium* que significa “noche igual”) de primavera (Roenneberg y Aschoff, 1990). Además, muchas enfermedades presentan una fluctuación estacional, mostrando una mayor prevalencia en invierno; se postula que la proximidad o cercanía física existente entre los seres humanos, junto con la baja humedad en invierno, podría contribuir

a un patrón de “temporada de gripe” (en inglés, *flu season*) cada año, influyendo sobre los patrones estacionales de las funciones inmunológicas (Nelson, 2004). Es más, algunos autores sugieren que las variaciones en la ingesta de dieta y la actividad física, principalmente debido a los cambios climatológicos estacionales, son atribuidas a los ritmos circanuales. Así, el incremento de ingestión de alimentos y la disminución de ejercicio en invierno (Shahar *et al.*, 2001; Plasqui y Westerterp, 2004; Yanai *et al.*, 2008), explicarían, al menos en parte, las variaciones fisiológicas con las estaciones en países en donde las mismas están bien diferenciadas, como sucede en España.

El principal indicador ambiental para el organismo, que permite la anticipación fisiológica de la estaciones, es el fotoperiodo o la duración del día (Nelson y Demas, 1996). De hecho, los cambios en la duración de la luz del día es el mejor y más preciso indicador del momento del año, permitiendo la realización de ajustes inmunológicos, necesarios antes de que las condiciones ambientales se deterioren (Nelson *et al.*, 1995). Se ha descrito que en los días cortos, como ocurre en invierno, el sistema inmunológico se potencia para contrarrestar cualquier supresión inmunológica debido a estresores invernales, aumentando así las probabilidades de supervivencia (Demas y Nelson, 1998b). Estos cambios en el fotoperiodo tienen efectos considerables sobre la estructura y el tamaño de los órganos linfáticos como el timo y el bazo. Son muchas las pruebas que indican un aumento en la masa tímica y esplénica durante los días cortos de finales de otoño y principios de invierno (Vaughan *et al.*, 1987; Nelson y Demas, 1996; Demas y Nelson, 1998c). De hecho, se ha demostrado que la oscuridad constante causa la hipertrofia y el aumento del número de células del timo, mientras que la exposición a la luz de manera constante causa la involución del timo y la muerte de los linfocitos (Mahmoud *et al.*, 1994). Ciertamente, el fotoperiodo que se observa en invierno aumenta la fracción de células blancas de la sangre, tanto en el número de linfocitos como de neutrófilos (Dobrowolska y Gromadzka-Ostrowska, 1984; Blom *et al.*, 1994; Mann *et al.*, 2000b). Lévi y colaboradores (1988a) encontraron una modulación estacional en el ritmo circadiano de linfocitos T y NK circulantes en hombres jóvenes, mostrando una variación estacional tanto de los patrones circadianos como de los valores medios a lo largo del día.

Todas estas fluctuaciones estacionales de las funciones inmunitarias podrían ser debidas a los cambios circanuales en la secreción de hormonas inmunomoduladoras (Mann *et al.*,

2000a). Se ha visto que la luz afecta la actividad de los órganos endocrinos como las gónadas, la corteza adrenal, la tiroides y la glándula pineal (Wurtman y Weisel, 1969; Vriend y Lauber, 1973). La melatonina, principal molécula cronobiótica, codifica la información sobre la duración del día ya que el curso de su liberación es proporcional a la duración de la noche. Así, en épocas de corto fotoperiodo, como ocurre en invierno, sus niveles serán mayores que durante el resto del año, por lo que además de constituir un reloj para el organismo, proporciona un calendario al mismo (Reiter, 1993). Dado que la administración de melatonina, hormona que ejerce un efecto directo sobre la respuesta inmunitaria a través de sus receptores situados en los leucocitos (Demas y Nelson, 1998a), favorece, especialmente, la función inmunológica mediada por células, como la proliferación de los linfocitos (Demas y Nelson, 1998a; Moore y Siopes, 2000), la mejora de dicha funcionalidad en invierno parece estar mediado a través de esta hormona (Nelson *et al.*, 1995).

Al igual que ocurre en el sistema circadiano, existen perturbaciones relacionadas con los ritmos circanuales. La alteración más conocida es el desorden afectivo estacional, cuyos pacientes sufren depresión en otoño e invierno, cuando los días se vuelven cortos y los niveles de luz disminuyen considerablemente. De manera similar a las previamente mencionadas alteraciones circadianas, los niveles de melatonina, el ciclo del sueño y el aumento de citoquinas pro-inflamatorias, junto con el de los niveles de CRH y cortisol, se encuentran en la base de la alteración neuroinmunoendocrina observada en este desorden (Wehr *et al.*, 2001; Káradóttir y Axelsson, 2001; Lam *et al.*, 2004; Turek, 2007; Bao *et al.*, 2008).

En conclusión, conocer el alcance por el cual la inmunología humana es afectada por los cambios estacionales, parece ser importante.

### 1.2.2. Los ritmos biológicos y su relación con el envejecimiento

Al igual que ocurre con los sistemas fisiológicos, el sistema circadiano está sujeto a cambios asociados al envejecimiento. El enfoque cronobiológico del envejecimiento tiene como objetivo estudiar la plasticidad de los organismos en relación a los cambios diarios y estacionales, con el fin de mejorar el bienestar y la calidad de vida de los mayores (Touitou *et al.*, 1997). Ciertamente, con el envejecimiento tiene lugar un deterioro funcional del sistema circadiano que se caracteriza por una disminución en la amplitud de los ritmos, la aparición de ritmos fragmentados, y el adelantamiento de fase de los mismos a medida que un individuo envejece (Lucas-Sánchez *et al.*, 2012). Esta desincronización interna que ocurre tanto en humanos como en otros animales viejos sanos, provoca cambios en la ritmicidad de una infinidad de variables fisiológicas como la temperatura, la presión sanguínea, y parámetros hematológicos y endocrinos, como el de la melatonina y el cortisol (Skene y Swaab, 2003; Hofman y Swaab, 2006; Kondratova y Kondratov 2012). Además, la alteración del ciclo sueño/vigilia, caracterizado por una disminución de la amplitud y fragmentación del sueño, es un rasgo muy común en individuos mayores, tanto humanos como otros mamíferos (Turek *et al.*, 1995; Dijk *et al.*, 1999). El ritmo de este ciclo que está controlado por el NSQ, es uno de los sincronizadores más importantes de los ritmos circadianos, por lo que los cambios en los patrones del sueño influirán sobre todas las estructuras temporales de las funciones fisiológicas. Se ha postulado que esta desincronización es la responsable del deterioro del estado fisiológico del bienestar en el individuo mayor (Touitou *et al.*, 1997). Además la disfunción del sueño puede, a su vez, llevar a cambios en las funciones inmunológicas, provocando un estado de pro-inflamación mayor (Prinz, 2004).

Las investigaciones *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los cambios asociados a la edad en el NSQ juegan un papel muy importante en la alteración circadiana. El NSQ al envejecer muestra una reducción en la amplitud de la actividad neuronal (Satinoff *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1995; Aujard *et al.*, 2001; Nygård *et al.*, 2005; Biello, 2009; Nakamura *et al.*, 2011) y un declive en los niveles de expresión de sus genes (Kawakami *et al.*, 1997; Davidson *et al.*, 2008; Kondratova y Kondratov, 2012) y en la secreción hormonal (Beynon *et al.*, 2009). En un estudio longitudinal, se observó una fuerte fragmentación de los ritmos, un déficit en las propiedades de las membranas, y a nivel tisular una desincronización de las neuronas del NSQ al avanzar la edad (Farajnia *et al.*, 2012). Además, el envejecimiento altera

el sistema circadiano de manera que la respuesta de los relojes circadianos centrales y periféricos a señales sincronizadoras se encuentra afectada. Así, frente a una perturbación externa como el *jet lag*, los individuos mayores muestran una resincronización lenta de sus osciladores periféricos (Sellix *et al.*, 2012). Los efectos de las citoquinas pro-inflamatorias sobre el NSQ, también, se alteran marcadamente con el envejecimiento (Sadki *et al.*, 2007), debido a una mayor señalización neuroinflamatoria sobre los receptores de citoquinas del NSQ, como se ha comprobado en ratones viejos (Bentivoglio *et al.*, 2006).

Estas observaciones prueban que el marcapasos circadiano es una diana del proceso del envejecimiento y, consecuentemente, el debilitamiento del NSQ podría explicar el deterioro de la sincronización entre el reloj central y los osciladores periféricos (Yamazaki *et al.*, 2002). Se ha comprobado que la melatonina juega un papel muy importante en esta desincronización, ya que su patrón de secreción circadiana, a través del estímulo del NSQ sobre la glándula pineal, también se encuentra afectada con el envejecimiento (Simonneaux y Ribelayga, 2003). De hecho, con la edad existe una disminución de la melatonina circulante, así como una disminución de su contenido en la glándula (Sack *et al.*, 1986; Waldhauser *et al.*, 1988; Schmid *et al.*, 1994; Reiter, 1995). Se ha observado que la suplementación con luz brillante durante el día, a unos niveles similares a los que se exponen los jóvenes, puede mejorar la secreción nocturna de melatonina y la calidad del sueño en los mayores que viven con pocos contactos sociales (Mishima *et al.*, 2001).

Por otro lado, debido al deterioro del sistema inmunitario (inmunosenescencia) y el incremento del estado pro-inflamatorio que se observa con el envejecimiento, la comunicación bidireccional entre los sistemas circadiano e inmunitario se encuentra alterada en los individuos mayores. Ciertamente, en ratones viejos, la administración periférica de LPS provoca un exagerado y prolongado *sickness behaviour*, observando una reducción de sus actividades locomotoras y de alimentación, incluso cuando los animales jóvenes sometidos a una situación similar ya se encuentran totalmente recuperados (Godbout *et al.*, 2008; Kinoshita *et al.*, 2009). Igualmente, en los animales viejos hay un aumento tardío y ausente de pico de la temperatura corporal (Barrientos *et al.*, 2009). Está ampliamente demostrado que con el envejecimiento la microglía cerebral se vuelve más reactiva, liberando cantidades excesivas de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-1 $\beta$  y, consecuentemente, produciendo una exagerada sintomatología del *sickness behaviour*.

(Dilger y Johnson, 2008; McLinden *et al.*, 2012). Este estado reactivo de la microglía se ha propuesto como la base de la respuesta inflamatoria discordante durante la senescencia (Dilger y Johnson, 2008). Es más, la inyección de LPS induce la generación de ROS, lo que provoca la activación de rutas inflamatorias a través del NF- $\kappa$ B en la microglía al envejecer en mayor medida que en el individuo joven (Nakanishi *et al.*, 2011). Así, los desafíos inmunitarios a un nivel periférico se traducen en una exacerbada neuroinflamación que va acompañada de un deterioro cognitivo y un *sickness behaviour* prolongado, al avanzar la edad (Wynne *et al.*, 2009; Kelley *et al.*, 2013).

Por lo tanto, se puede concluir que la conexión desregulada entre el sistema inmunológico central y el periférico con la edad, está probablemente implicado en la perturbación del sistema circadiano. Y a la inversa, el deterioro de los componentes que forman parte del sistema circadiano con el envejecimiento, afectará la capacidad funcional de las células inmunitaria, lo que podría contribuir a los procesos relacionados con la inmunosenescencia.

### **1.3. PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON LA OXIDACIÓN E INFLAMACIÓN Y ESTADO DEL SISTEMA INMUNITARIO**

#### **1.3.1. La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica y el sistema inmunitario**

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por la afectación de las vías respiratorias debido a la obstrucción crónica del flujo de aire en los bronquios, junto con alteraciones del parénquima pulmonar en forma de enfisema. Constituye una patología que si bien es tratable, no es del todo reversible (Chung, 2001; Fairclough *et al.*, 2008). Es una enfermedad progresiva, ya que la limitación respiratoria empeora con el tiempo, y afecta al 10,2% de la población entre 40 y 80 años en España. Su prevalencia es mayor en los varones y aumenta con la edad, con el historial de tabaquismo y parece ser que también con el menor nivel educacional (Miravittles *et al.*, 2009). De acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística, la EPOC es la quinta causa de muerte en la población de España –la cuarta en varones- y es una de las pocas afecciones cuya mortalidad sigue aumentando. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que las muertes atribuidas a esta

enfermedad aumentarán más de un 30% a nivel mundial en los próximos 10 años (Fairclough *et al.*, 2008).

El principal factor responsable de la EPOC es el humo del tabaco. De hecho, al menos el 90% de los pacientes diagnosticados con EPOC han sido fumadores crónicos (American Thoracic Society, 1996). Sin embargo, sólo una minoría de los fumadores desarrolla esta afección, hecho que se desconoce su causa (McCrea *et al.*, 1994). Además, las personas que han estado expuestas a contaminantes, como las partículas y los gases nocivos, por razones laborales o por la contaminación ambiental, también pueden desarrollar esta enfermedad (Raheison y Girodet, 2009).

La patogénesis de la EPOC se caracteriza por la remodelación estructural y la inflamación de los pulmones. La destrucción del parénquima pulmonar, el aumento del grosor de las vías respiratorias bajas hasta sus zonas más distales debido a la hiperplasia e hipertrofia del epitelio y de las glándulas productoras de moco, así como el aumento de la masa del músculo liso, junto con la hipersecreción de la mucosa, la fibrosis y el daño tisular del tejido pulmonar dificultan no sólo el flujo del aire sino también el intercambio gaseoso que tiene lugar en los alveolos, lo que a su vez da lugar a la hipertensión de los vasos pulmonares (Chung, 2001; Núñez-Naveira *et al.*, 2007; Fairclough *et al.*, 2008). Así, la EPOC es una mezcla de distintas enfermedades –bronquitis crónica, enfermedad de las vías respiratorias bajas y enfisema pulmonar-, patologías que muestran distintos patrones de inflamación, por lo que es difícil establecer la fisiopatología de la EPOC de manera concreta (Tetley, 2005).

La destrucción y remodelación del tejido pulmonar es el resultado de la inflamación crónica y los elevados niveles de oxidación presentes en los pulmones. Así, si bien no está del todo claro el mecanismo patogénico exacto que subyace a la EPOC, existe un consenso general sobre la certeza de la implicación de esos dos procesos, oxidación e inflamación, en la patogenia de la enfermedad (MacNee, 2000; Oudijk *et al.*, 2003; Dekhuijzen, 2004). Por un lado, en la EPOC tiene lugar una compleja interacción entre las células del sistema inmunitario innato y adaptativo en el pulmón (Fairclough *et al.*, 2008), con elevados niveles de macrófagos alveolares, neutrófilos y linfocitos T citotóxicos, y la liberación exacerbada de múltiples mediadores inflamatorios en respuesta a la inhalación de partículas nocivas o gases tóxicos, especialmente el humo del tabaco (Barnes *et al.*, 2003). Los neutrófilos y

macrófagos desempeñan un papel clave en la patogenia ya que liberan enzimas proteolíticas y generan oxidantes, los cuales causan daño tisular, y secretan citoquinas y quimioquinas que potencian la inflamación y desencadenan la respuesta inmunitaria (Tetley, 2005). Así, la respuesta inflamatoria a la inhalación de humo, inicialmente limitada, progresa a una respuesta inflamatoria crónica persistente debido a la exposición prolongada al agente dañino (Oudijk *et al.*, 2003). Por otro lado, los elevados niveles de ROS procedentes, principalmente, del humo del tabaco, así como los derivados de la producción exacerbada de los leucocitos presentes en las vías respiratorias, provocan una elevada carga oxidante intrapulmonar, lo que conduce al desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, provocando estrés oxidativo (MacNee, 2000; Dekhuijzen, 2004). Los elevados niveles de estrés oxidativo, a su vez, amplifican la inflamación a través de la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1, los cuales regulan la expresión génica de mediadores pro-inflamatorios y oxidantes (MacNee, 2000; Barnes *et al.*, 2003). Además, los oxidantes inactivan las antiproteinasas, contribuyen al daño irreversible del parénquima y de las paredes bronquiales así como a la hipersecreción de mucosidad, alterando también la respuesta inmunitaria local al secuestrar neutrófilos en la microvasculatura pulmonar. Es más, los oxidantes aumentan el riesgo de padecer infecciones y una exacerbación de la enfermedad, que a su vez acelerará el declive de la función pulmonar (MacNee y Rahman, 2001; Dekhuijzen, 2004).

La EPOC se clasifica en función de su gravedad mediante la prueba de la espirometría, puesto que en general, el grado de anomalía espirométrica refleja la severidad de la enfermedad. Así, la clasificación de la EPOC se realiza empleando el parámetro FEV<sub>1</sub> o volumen espirado máximo en el primer segundo de la espiración forzada (del inglés, *Forced Expiratory Volume in the 1<sup>st</sup> second*). Esta clasificación se realiza por razones de simplicidad, ya que los valores o puntos de corte de la clasificación no han sido validados clínicamente. La Iniciativa Global de la EPOC (GOLD; del inglés, *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) emplea, además del FEV<sub>1</sub>, el cociente FEV<sub>1</sub>/FVC (FVC o la capacidad vital forzada; del inglés, *Forced Vital Capacity*). Así, a mayor gravedad de un paciente con EPOC, los valores de FEV<sub>1</sub> y del cociente FEV<sub>1</sub>/FVC disminuirán. La EPOC se clasifica (Rabe *et al.*, 2007) en los siguientes estadios:



- ✓ **Estadio I (EPOC leve)**,  $FEV_1/FVC < 0,7$ ;  $FEV_1 \geq 80 \%$  del valor de referencia;
- ✓ **Estadio II (EPOC moderada)**,  $FEV_1/FVC < 0,7$ ;  $80 \% > FEV_1 > 50 \%$  del valor de referencia;
- ✓ **Estadio III (EPOC grave o severo)**,  $FEV_1/FVC < 0,7$ ;  $50 \% > FEV_1 > 30 \%$  del valor de referencia; y
- ✓ **Estadio IV (EPOC muy grave)**,  $FEV_1/FVC < 0,7$ ;  $FEV_1 < 30 \%$  del valor de referencia.

Se encuentra ampliamente demostrado que la gravedad de esta enfermedad se correlaciona con diversos parámetros de inflamación en el pulmón. Así, a mayor obstrucción de las vías respiratorias, es decir, a mayor disminución del valor de  $FEV_1$ , hay un aumento del número de células inflamatorias, de los niveles de IL-6, de los receptores solubles de TNF y de la PCR en esputo (Vernooy *et al.*, 2002; He *et al.*, 2010). Esta correlación inversa se da también con los niveles de IL-4, IL-10 e IL-13 en los linfocitos T CD8+ del lavado broncoalveolar (Barceló *et al.*, 2006), con el porcentaje de linfocitos T CD8+ que producen TNF- $\alpha$  del lavado broncoalveolar e intraepiteliales (Hodge *et al.*, 2007), y con los niveles de IL-8 liberados por los macrófagos alveolares (He *et al.*, 2003). Por lo tanto, la extensión de la reacción inflamatoria en el pulmón puede servir para valorar la severidad de la enfermedad.

Sin embargo, la patogénesis y las manifestaciones clínicas de la EPOC no están restringidas al pulmón. De hecho, actualmente se considera que la EPOC es una **enfermedad sistémica**, donde los pacientes, además de sufrir pérdida de peso, disfunción del músculo esquelético, y consecuentemente, el debilitamiento de la condición física, padecen estrés oxidativo y elevados niveles de mediadores inflamatorios en la circulación (Wouters *et al.*, 2002; Rahman, 2002; Dourado *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la causa de los efectos sistémicos sería el desbordamiento de los elevados niveles de inflamación/oxidación del compartimento pulmonar al sistema circulatorio, aunque otros autores proponen como candidato a la hipoxia sistémica (Wouters, 2005; Sinden y Stockley, 2010). Además, la elevada inflamación sistémica de los pacientes con EPOC provoca un mayor riesgo a padecer otras enfermedades, como las cardiovasculares, la osteoporosis y la diabetes de tipo II (Gan *et al.*, 2004; Sinden y Stockley, 2010). El conocimiento de todos estos efectos sistémicos de

la EPOC muestra una gran relevancia clínica ya que además de poder ayudar a modificar la gravedad de la enfermedad, podrían permitir una mejor clasificación y tratamiento de la misma (Agustí *et al.*, 2003).

Sin embargo, existe cierta controversia en relación a la existencia o no de correlaciones entre la inflamación local y la sistémica; mientras que algunos investigadores no encuentran asociaciones (Vernooy *et al.*, 2002; Barceló *et al.*, 2006), otros indican un paralelismo entre el aumento de marcadores inflamatorios en las vías respiratorias y en la sangre periférica (He *et al.*, 2010), aunque en el primer compartimento ocurriría antes en el tiempo, incluso en sujetos con EPOC de grado leve (Foschino Barbaro *et al.*, 2007). Además, la bibliografía también apunta a correlaciones significativas entre el estado de oxidación del pulmón y el sistémico (Zeng *et al.*, 2013). De hecho, desde hace ya casi una década, son muchos los trabajos que describen correlaciones entre algunas variables sistémicas y el grado de severidad de la EPOC, y demuestran la utilidad de ciertos parámetros relacionados con la oxidación, la inflamación y la activación de leucocitos en sangre como marcadores de la progresión de la enfermedad. Así, a menores valores de FEV<sub>1</sub> (esto es, a mayor severidad), se han descrito menores porcentajes de linfocitos T CD4+ circulantes (Zhu *et al.*, 2009), y una mayor producción de IL-2 por parte de estas células, así como un aumento en el porcentaje de linfocitos Th17 en circulación (Vargas-Rojas *et al.*, 2011) y de T CD8+ activados, junto con una mayor producción de IFN- $\gamma$  por parte de estas últimas células (Zhu *et al.*, 2009). Además, la progresión de la EPOC se encuentra estrechamente asociada con la activación de los neutrófilos sanguíneos, los cuales muestran una sobreexpresión de mediadores inflamatorios, como IL-1 $\beta$  entre otros. Tales compuestos inflamatorios muestran una correlación negativa con los valores de FEV<sub>1</sub> (Oudijk *et al.*, 2005). En relación a marcadores de oxidación y defensas antioxidantes, también se han descrito asociaciones entre la severidad de la obstrucción de las vías respiratorias y el balance oxidante/antioxidante sistémico. Así, a menores valores de FEV<sub>1</sub>, se han observado mayores niveles plasmáticos de peroxinitritos y menores del poder antioxidante en plasma (Nadeem *et al.*, 2005; Ben Anes *et al.*, 2014).

Son muchos los trabajos que han valorado la **capacidad funcional de las células inmunitarias periféricas** en la EPOC, si bien son muy pocos los que comparan dicha función entre los distintos grados o estadios de la enfermedad. Así, la mayoría de veces, los

pacientes con EPOC se analizan como un único grupo de estudio, y a pesar de que se indican en las publicaciones el valor medio de FEV<sub>1</sub> del grupo, el intervalo de sus valores resulta siempre muy amplio.

En lo que respecta a la *capacidad adherente de los leucocitos circulantes*, la bibliografía apunta a una mayor expresión de las moléculas de adhesión CD11b y Mac-1 (CD11b/CD18) en la superficie de los neutrófilos en pacientes con EPOC (Noguera *et al.*, 1998; 2001; Blidberg *et al.*, 2013), si bien otros autores indican una disminución de Mac-1 y una ausencia de diferencias en los niveles de CD11b, LFA-1 y CD35 entre pacientes e individuos sanos (Yurdakul *et al.*, 2004; Wehlin *et al.*, 2005). En la superficie de los linfocitos no se han descrito diferencias significativas en los niveles de LFA-1 y Mac-1 (Yurdakul *et al.*, 2004). Por otro lado, la sensibilidad de los neutrófilos a factores quimiotácticos se encuentra aumentada, lo que resulta en una mayor *quimiotaxis* de estas células, frente a estímulos como el fMLP, en pacientes con EPOC con respecto a controles sanos (Burnett *et al.*, 1987; Drost y MacNee, 2002), aunque otros autores no aprecian diferencias estadísticamente significativas en este aumento (Blidberg *et al.*, 2012). En relación a la capacidad quimiotáctica de los linfocitos periféricos, sin embargo, no se ha encontrado ningún estudio en la bibliografía. En cuanto a la *actividad fagocítica* de neutrófilos, Prieto y colaboradores (2001) exponen una disminución significativa de esta función en pacientes con EPOC en relación a voluntarios sanos. Por otro lado, los neutrófilos de los pacientes con EPOC no muestran diferencias significativas en la *liberación de O<sub>2</sub><sup>-</sup>* ni de la producción de ROS en condiciones basales en relación a sujetos sanos (van Beurden *et al.*, 2003; Wehlin *et al.*, 2005), pero sí cuando estas células son estimuladas con fMLP, observando un aumento de la liberación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y de los ROS en general (Noguera *et al.*, 2001; Nadeem *et al.*, 2005). No obstante, Noguera y colaboradores (2001) exponen un aumento de los ROS ya en condiciones basales. Al relativizar la liberación de ROS, relacionando la condición estimulada con la basal, por el contrario, se ha descrito que los pacientes de EPOC muestran una disminución del estallido oxidativo en presencia de TNF- $\alpha$ , fMLP y TNF- $\alpha$ +fMLP (Wehlin *et al.*, 2005). En lo que respecta a la *actividad citotóxica de las células NK* frente a la línea tumoral K562, la misma se encuentra significativamente disminuida con la enfermedad (Prieto *et al.*, 2001; Urbanowicz *et al.*, 2009). Al considerar la *respuesta linfoproliferativa*, los individuos con EPOC, en comparación con los controles sanos, presentan una disminución de

la misma al estimular los linfocitos con PHA (Reyes *et al.*, 2006), así como un aumento de la apoptosis de linfocitos T en estas mismas condiciones de cultivo (Hodge *et al.*, 2003).

Por otro lado, a pesar de que la bibliografía sobre los niveles de **citoquinas** por parte de los leucocitos de personas con EPOC es muy extensa, especialmente en lo que respecta a las citoquinas **TNF- $\alpha$** , **IL-6** e **IL-8**, son pocos los trabajos que emplean leucocitos periféricos en esos estudios. El *esputo*, el *lavado broncoalveolar* y el *cultivo de macrófagos alveolares* en presencia de mitógenos, además del plasma, son las muestras típicamente usadas en el estudio de la EPOC. En general, se podría decir que los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 se encuentran aumentados en los tres materiales pulmonares mencionados, especialmente los de IL-8, quimioquina clave responsable de la elevada cantidad de neutrófilos presentes en los pulmones (Keatings *et al.*, 1996; He *et al.*, 2001; 2003; Chung, 2001; Takizawa, 2007). En cuanto a los niveles de estas citoquinas en *suero* o *plasma*, mientras que algunos autores indican un aumento en los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 con la enfermedad (Gan *et al.*, 2004; Foschino Barbaro *et al.*, 2007), otros no describen variaciones en sus niveles ni en los de IL-8 (Schmidt-loanas *et al.*, 2006; Blidberg *et al.*, 2012). Los pocos trabajos encontrados sobre el análisis de citoquinas procedentes de *leucocitos periféricos* muestran niveles intracelulares tras realizar un cultivo en presencia de PMA e ionomicina. Así, mientras que algunos autores observan un aumento en los valores de TNF- $\alpha$  en monocitos y linfocitos T de pacientes con EPOC (Hodge *et al.*, 2003), otros no aprecian diferencias en los niveles intracelulares de TNF- $\alpha$  en linfocitos T CD4+ y CD8+ periféricos entre pacientes y controles (Barceló *et al.*, 2006). Por otro lado, la **IL-10**, citoquina esencial debido a su carácter anti-inflamatorio, no ha sido tan extensamente estudiada en esta enfermedad. En los linfocitos T del lavado broncoalveolar, de pacientes con EPOC, se han descrito niveles intracelulares elevados de IL-10, especialmente en los CD8+, mientras que en los linfocitos procedentes de sangre periférica no se han encontrado variaciones en los valores de esta citoquina entre los pacientes y los controles (Barceló *et al.*, 2006). Sin embargo, el análisis llevado a cabo por Zhu y colaboradores (2009) en linfocitos T CD4+ periféricos revela un menor porcentaje de células productoras de IL-10 en personas con la enfermedad.

En cuanto a los niveles de **defensas antioxidantes** en individuos con EPOC, los trabajos realizados, al igual que se ha referido para los que analizan la función inmunitaria y los niveles de citoquinas, no suelen en muchos casos comparar pacientes en distintos estadios

de la enfermedad. Por un lado, se encuentra ampliamente demostrada la disminución de la *capacidad antioxidante del plasma* en los pacientes con EPOC en relación a sujetos sanos (Rahman *et al.*, 1996; Nadeem *et al.*, 2005; Gencer *et al.*, 2011; Ben Anes *et al.*, 2014), lo que indicaría una alteración en el equilibrio de compuestos oxidantes y antioxidantes con la enfermedad. Además, Pirabbasi y colaboradores (2012) describieron que los pacientes con el grado más severo de la enfermedad (estadio IV) mostraban los niveles más bajos de la capacidad antioxidante total plasmática. Por otro lado, no se ha encontrado ningún estudio que analice los niveles intracelulares de *glutación* en leucocitos de personas con EPOC, aunque sus niveles plasmáticos, que aparecen disminuidos en general, sí se encuentran ampliamente descritos (Liu *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2013; Ben Moussa *et al.*, 2014).

Son muchos los ejemplos de que la activación crónica del sistema inmunitario, incluso en individuos jóvenes, como ocurre en las enfermedades autoinmunes, el cáncer, la infección por VIH y otras infecciones crónicas, promueve cambios en la respuesta inmunitaria que son paralelos a los observados en individuos cronológicamente mayores (Tarazona *et al.*, 2002). Éste podría ser el caso de la EPOC, tal y como proponen Sharma y colaboradores (2009), donde los pacientes mostrarían cambios que mimetizan los observados en el pulmón envejecido. Esto ha llevado a postular a la EPOC como un “fenotipo de envejecimiento acelerado”. De hecho, incluso a un nivel sistémico, se ha observado una inversión del cociente CD4/CD8 en los leucocitos sanguíneos de las personas con EPOC (Hodge *et al.*, 2007), característica típica del envejecimiento (Pawelec, 2012) y parámetro relacionado con un aumento de la tasa de mortalidad a partir de los 60 años de edad (Wikby *et al.*, 2008). Es más, el propio envejecimiento del sistema inmunitario podría contribuir al desarrollo de la EPOC (Sharma *et al.*, 2009). Además, los diversos efectos sistémicos que presenta esta enfermedad, junto con la elevada comorbilidad que sufren los pacientes, se han correlacionado con la supervivencia y el estado de salud (Barnes *et al.*, 2003; Wouters, 2005; Dourado *et al.*, 2006). Si bien, el grado de severidad de la enfermedad es un factor determinante en la salud de los pacientes, éstos generalmente mueren prematuramente, por la enfermedad en sí o por las complicaciones derivadas de otras enfermedades asociadas a la EPOC (Rabe *et al.*, 2007).

### 1.3.2. La Enfermedad de Alzheimer y el sistema inmunitario

En las últimas décadas se ha observado un aumento dramático de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento debido, principalmente, al aumento en la esperanza de vida y el envejecimiento de la población. Éste es el caso de la Enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad neurodegenerativa y causa de demencia más frecuente en individuos de edad avanzada. Los datos indican que aproximadamente 35,6 millones de personas de todo el mundo padecen actualmente demencia y que este número se cuadruplicará para el año 2050 a menos que se encuentre un tratamiento o una cura efectiva (extraído de [www.who.int](http://www.who.int)). Teniendo en cuenta que la EA constituye el 60-80% de los casos de demencia y el alto impacto socioeconómico que supone el aumento de su incidencia, es comprensible que los esfuerzos científicos hayan sido dirigidos a esclarecer los mecanismos etiopatológicos que subyacen a esta enfermedad, los cuales hoy en día no son todavía conocidos totalmente.

Las principales características neuropatológicas de la EA son las placas beta amiloide ( $A\beta$ ) y los ovillos neurofibrilares (ONF). Las placas se generan debido a la sobreproducción y acumulación del péptido  $A\beta$  a través del proceso amiloidogénico, y/o a su menor eliminación, dando lugar a la formación de depósitos de los mismos tanto a nivel extracelular como dentro de las neuronas (Selkoe, 2000; Tseng *et al.*, 2004; Gouras *et al.*, 2005; LaFerla *et al.*, 2007; Di Carlo, 2010; Rajadas *et al.*, 2013). Por otro lado, los ONF son producto de la hiperfosforilación de la proteína tau, la cual en esas condiciones desestabiliza a los microtúbulos de los axones y dendritas. Esto provoca una pérdida en la capacidad de mantener el transporte axonal y las conexiones sinápticas de las neuronas (Iqbal *et al.*, 2005; Jean y Baas, 2013). Está ampliamente demostrado que en el cerebro de una persona con EA ocurre una disfunción neuronal y sináptica progresiva que lleva, finalmente, a la muerte neuronal (DeKosky y Scheff, 1990; Jana y Pahan, 2004), hecho que se correlaciona con el deterioro cognitivo progresivo (Terry *et al.*, 1991; Pooler *et al.*, 2013). Además, se produce un déficit colinérgico en la corteza cerebral y en el hipocampo (Dringenberg, 2000; Leuner *et al.*, 2007). Todos estos daños cerebrales se traducen en una sintomatología clara pero de una gran heterogeneidad clínica que se caracteriza por una pérdida progresiva de las habilidades cognitivas y de la memoria, déficit visuoespacial, afasia, pérdida de las funciones ejecutoras, y alteraciones emocionales como psicosis, depresión, apatía y agitación

(Cummings, 2000; Mattson, 2002).

Durante las últimas 2 décadas ha supuesto un gran reto reproducir la patología neuronal y la sintomatología comportamental de la EA en modelos animales (Janus y Westaway, 2001, Giménez-Llort *et al.*, 2007). El análisis de los tejidos cerebrales de pacientes con Alzheimer, al ser *postmortem*, proporcionan una información sobre las alteraciones moleculares presentes al final del proceso de la enfermedad, y no discriminan de forma clara entre los cambios debidos al Alzheimer y los que son consecuencia de la degeneración neuronal asociada al envejecimiento (Martin *et al.*, 2008). Los avances en técnicas genéticas y en la identificación de los genes implicados en el proceso patológico del Alzheimer Familiar, la proteína precursora amiloide (APP), y las presenilinas (PS), tanto la PS1 como la PS2, han hecho posible el desarrollo de una serie de modelos transgénicos, sobre todo en ratones. El objetivo ha sido poder reproducir en ellos las placas A $\beta$  y/o los ONF, y estudiar los mecanismos moleculares implicados en la aparición y el desarrollo de la EA, además de permitir encontrar posibles dianas terapéuticas (Hsiao *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 1996; Holcomb *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2000; 2001; Sasaki *et al.*, 2002; Oddo *et al.*, 2003b; Oakley *et al.*, 2006).

En la presente tesis, se ha empleado el modelo murino triple transgénico para la EA (3xTgAD), que alberga los transgenes APP<sub>Swe</sub> y tau<sub>P301L</sub> en un mutante knock-in para PS1<sub>M146V</sub>, y que representa el primer y único modelo que mimetiza ambas manifestaciones neuropatológicas del cerebro humano con la EA (Oddo *et al.*, 2003a; 2003b). En estos ratones 3xTgAD, dichas manifestaciones aparecen y se establecen en las mismas regiones cerebrales que en el ser humano y de manera dependiente de la edad. Así, a los 2,5 meses comienza la alteración de la homeostasis neuronal; a los 3-4 meses se aprecia la inmunoreactividad frente a las placas A $\beta$  intracelulares y a los 6 meses se encuentran ya los primeros depósitos extracelulares. La alteración de la proteína tau se inicia a los 12 meses, edad en la que la patología A $\beta$  está ya bien instaurada, y finalmente a los 15 meses se observan los ONF (Oddo *et al.*, 2003a; 2003b). Además, en este modelo se desarrollan, también de manera dependiente de la edad, una serie de características típicas de la EA como son la disfunción sináptica, que se correlaciona con la acumulación de la A intraneuronal (Oddo *et al.*, 2003b), la gliosis reactiva (Kitazawa *et al.*, 2005), el estrés oxidativo en neuronas del córtex y del hipocampo (Jo *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2012), el

déficit en el sistema colinérgico, en el aprendizaje y en la memoria, así como una serie de alteraciones del comportamiento asociadas a demencia (Billings *et al.*, 2005; Giménez-Llort *et al.*, 2007; Caccamo *et al.*, 2010; Sterniczuk *et al.*, 2010; España *et al.*, 2010).

Son muchas las evidencias que indican el papel importante del **estrés oxidativo** en la aparición, progresión y patogénesis de la disfunción, y en la apoptosis neuronal que tiene lugar en la EA (Coyle y Puttfarcken, 1993; Markesbery, 1997; Butterfield, 1997; Zhu *et al.*, 2007; Recuero *et al.*, 2009). A pesar de que no está bien establecido si su implicación es un evento primario o secundario, está claro que los radicales libres forman parte de una cascada de reacciones, implicados en los agregados A $\beta$  y los ONF, las cuales resultan perjudiciales para las moléculas y células (Pappolla *et al.*, 1992; Markesbery, 1997; Butterfield, 1997). Hay muchas pruebas del elevado estrés oxidativo presente en esta enfermedad, como son la existencia de numerosas fuentes de radicales libres, el aumento de metales con actividad redox, de los productos de glicación avanzada (AGE), del óxido nítrico, la excesiva activación de la microglía y el hecho de que el péptido A *per se* sea capaz de generar radicales libres. Todo ello está relacionado con las numerosas lesiones que se aprecian en el cerebro de individuos con Alzheimer causadas por el ataque de los radicales libres, como son el daño al ADN, la oxidación proteica, la peroxidación lipídica, y la presencia de AGEs (Butterfield, 1997; Christen, 2000; Miranda *et al.*, 2000; McGeer y McGeer, 2003). Además, estudios recientes sugieren que la presencia del péptido A intracelular podría estar interaccionando con la membrana mitocondrial, interfiriendo en el flujo normal de electrones, lo que resultaría en un metabolismo energético defectuoso y en un aumento de la producción de ROS (Leuner *et al.*, 2007; Muirhead *et al.*, 2010; Viña *et al.*, 2011; Venkateshappa *et al.*, 2012; Bobba *et al.*, 2013). En este contexto, los sistemas endógenos de defensa antioxidante, aunque activados desde estadios tempranos de la enfermedad en las zonas con presencia de placas y neuritas distróficas (Pappolla *et al.*, 1992; Omar *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2004), serían incapaces de responder adecuadamente a ese aumento excesivo de radicales libres (Bains y Shaw, 1997; Marcus *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 2000; Karelson *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2012).

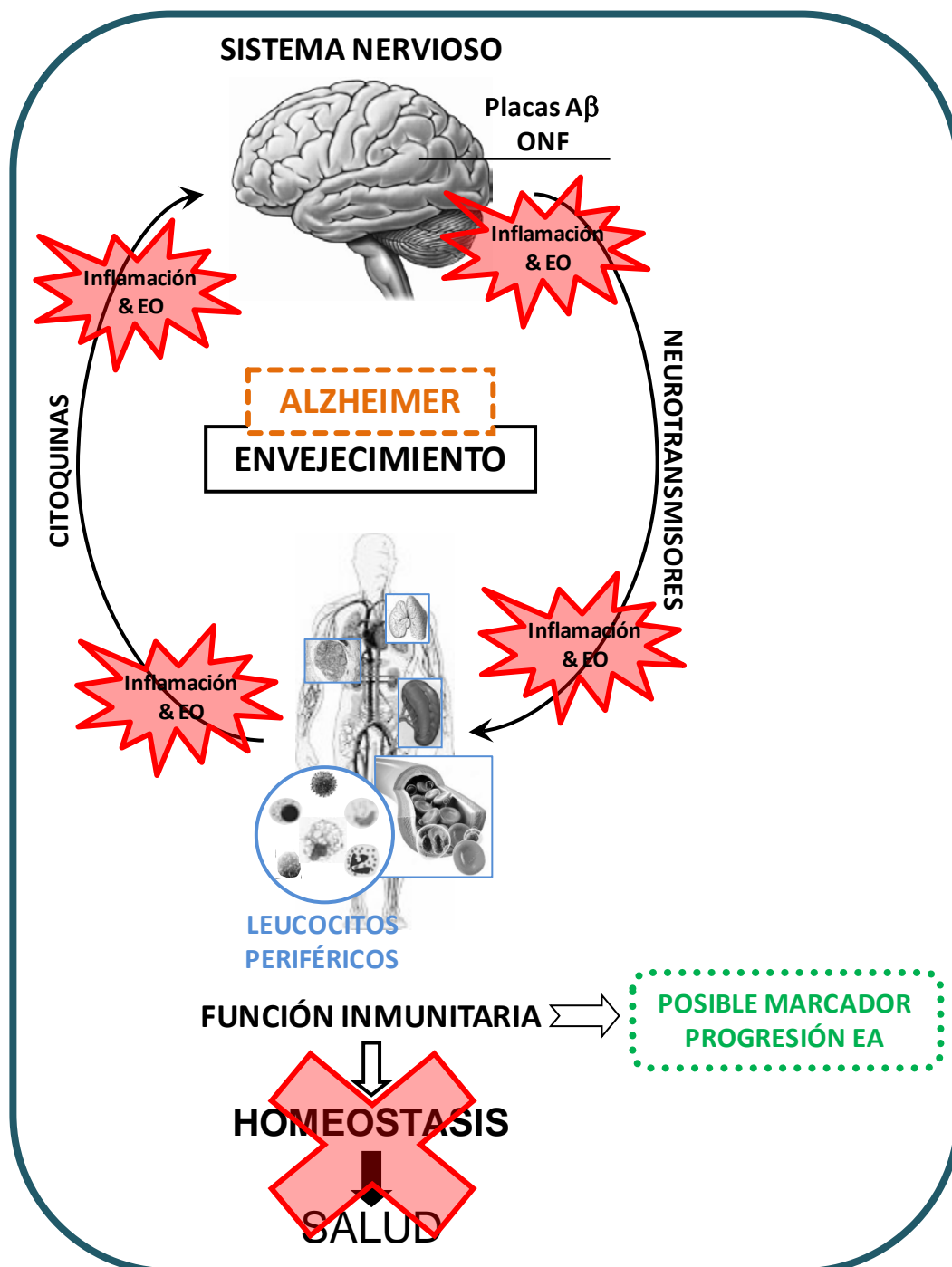
Otra característica del cerebro con EA es la presencia de **neuroinflamación**. El proceso inflamatorio crónico es provocado por la presencia de neuronas y neuritas dañadas, los agregados A $\beta$  y los ONF, y mediado por la sobreactivación de las células de la inmunidad



innata del cerebro, la microglía, y también los astrocitos (McGeer y McGeer, 1995; Akiyama *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2001). Estas células generan toda una serie de mediadores inflamatorios y de oxidación que se retroalimentan y se propagan en el tiempo, favoreciendo la formación de depósitos A $\beta$  y de ONF, y exacerbando así la patología de manera progresiva (Mrak *et al.*, 1995; Marx *et al.*, 1998; Kitazawa *et al.*, 2005). Además, se ha comprobado que una fuerte respuesta inflamatoria puede ser tóxica para las neuronas y contribuir a la muerte celular (McGeer y McGeer, 1995). No cabe la menor duda de que el sistema inmunológico juega un papel muy importante en el proceso neurodegenerativo de la EA. En un principio, su papel sería proteger contra el desarrollo de la enfermedad, para lo cual las células microgliales migran a los agregados A $\beta$  con el fin de fagocitarlos y degradarlos. Pero la acumulación del daño tisular y el aumento de mediadores y metabolitos tóxicos parecen hacer fracasar a este mecanismo de defensa, constituyendo la base de los procesos inflamatorios crónicos del cerebro en la EA (Marx *et al.*, 1998; Rogers y Lue, 2001; Sasaki *et al.*, 2002; Cirrito y Holtzman, 2003; Luca *et al.*, 2003; McGeer y McGeer, 2003; Blasco y Grubeck-Loebenstein, 2003; Lucas *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2009; Noda y Suzumura, 2012).

En la última década la investigación científica ha demostrado ampliamente que el Alzheimer va acompañado de una alteración sistémica, tanto a nivel inmunológico como oxidativo, reflejo del daño existente en el cerebro (Fig. 6). Por su parte, los leucocitos periféricos parecen estar implicados en el proceso patológico. Las células inmunitarias, y concretamente las fagocíticas mononucleares (monocitos/macrófagos) son capaces de migrar al cerebro con EA, cruzando la barrera hematoencefálica y penetrando en la zona perivascular y en el parénquima cerebral, con el fin de controlar la inflamación local y eliminar los depósitos A $\beta$  (Fiala *et al.*, 1998; Hickman y El Khoury, 2010; Cameron y Landreth, 2010; Mizwicki *et al.*, 2013; Malavolta *et al.*, 2013). En esta migración jugarían un papel muy importante las citoquinas, y especialmente las quimioquinas (Xia y Hyman, 1999; Hickman y El Khoury, 2010; Rezai-Zadeh *et al.*, 2011). A su vez, los linfocitos T periféricos pueden incidir en este proceso o bien directamente infiltrándose en el cerebro o indirectamente activando a los fagocitos mononucleares periféricos (Town *et al.*, 2005). Así, la comunicación bidireccional existente entre el sistema nervioso y el sistema inmunológico que se establece tanto a nivel central como periférico (Besedovsky y Del Rey, 2007; 2011), podría

proporcionar marcadores periféricos que reflejaran la aparición y la progresión del Alzheimer (Giménez-Llort *et al.*, 2012) (Fig. 6).



**Figura 6.** La comunicación bidireccional existente entre el sistema nervioso y el inmunitario podría proveer de marcadores periféricos para la enfermedad de Alzheimer (EA). Debido al estrés oxidativo (EO) e inflamatorio, el deterioro en los sistemas reguladores y la comunicación que se establece entre ellos con el envejecimiento, provoca la pérdida de la homeostasis y por tanto de la salud. Esta pérdida de homeostasis se encuentra más exacerbada con la EA, observando una mayor alteración inmunitaria a nivel periférico. Así, el análisis de la función inmunitaria podría ser un marcador de la progresión de la EA. A $\beta$ : Beta amiloide; ONF: Ovillos neurofibrilares.

Son varios los trabajos que se centran en caracterizar los niveles de subpoblaciones leucocitarias periféricas en los pacientes con EA para comprobar su grado de implicación y activación, aunque en muchos de los casos los datos existentes son contradictorios. Algunos investigadores indican disminuciones en el número de linfocitos T totales y CD8, linfocitos B y células *naïve* en pacientes con Alzheimer con respecto a controles sanos de su misma edad (Hu *et al.*, 1995; Richartz-Salzbürger *et al.*, 2007; Speciale *et al.*, 2007; Larbi *et al.*, 2009). Otros estudios muestran un aumento de algunos linfocitos, como los T CD4 (Schindowski *et al.*, 2007; Larbi *et al.*, 2009), pero incluso, se ha descrito una falta de diferencias en el número de linfocitos, incluido el de las células NK, entre ambos grupos (Aragá *et al.*, 1990; Richartz-Salzbürger *et al.*, 2007; Speciale *et al.*, 2007; Bonotis *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2012). Estas discrepancias podrían ser atribuidas a diferencias en los criterios de inclusión, a la fase de demencia en que se encuentran los sujetos, la presencia de comorbilidad, el uso de tratamientos farmacológicos, e incluso a variaciones técnicas. Hay que destacar la existencia de trabajos que observan una correlación entre los niveles de determinadas subpoblaciones, como linfocitos T CD4, CD8 y neutrófilos CD11b, y la severidad de la enfermedad (Shalit *et al.*, 1995; Lombardi *et al.*, 1999; Scali *et al.*, 2002).

Por otro lado, respecto a la capacidad funcional de las células inmunitarias, algunos autores apuntan a una disminución de la actividad citotóxica de las células NK en pacientes con Alzheimer (Aragá *et al.*, 1991; Irwin *et al.*, 1991), así como que este cambio podría estar relacionado con la alteración cognitiva y la progresión de la EA (Prolo *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2012). En cuanto a la función de los neutrófilos de sangre periférica de pacientes, se ha descrito una menor capacidad, tanto de la actividad digestiva como de la fagocítica, en individuos con EA en relación a controles de su misma edad (Davydova *et al.*, 2003), si bien otros autores no observan esas diferencias (Song *et al.*, 1999; Beloosesky *et al.*, 2002). Respecto a la capacidad de proliferación de los linfocitos periféricos en respuesta a distintos estímulos, algunos investigadores describen una disminución de la misma en pacientes con EA (Hu *et al.*, 1995; Stieler *et al.*, 2001), otros no ven diferencias (Leffell *et al.*, 1985), e incluso hay estudios en los que se observa una mayor respuesta proliferativa (Song *et al.*, 1999).

Aunque no existe un consenso en el papel que juega el sistema inmunológico en el Alzheimer, está ampliamente aceptado que existe una alteración sistémica a nivel

inmunitario (Britschgi y Wyss-Coray, 2007). Así, se puede destacar que hay toda una serie de trabajos que apuntan a una activación sistémica exacerbada de linfocitos periféricos, mediada por el proceso inflamatorio crónico que tiene lugar en el Alzheimer (Town *et al.*, 2005; Schindowski *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2014), proponiéndose una sobreactivación del sistema inmunológico periférico en la EA (Casal *et al.*, 2003). No obstante, otros investigadores postulan un declive general en las respuestas inmunológicas, e incluso proponen la existencia de una inmunosenescencia prematura asociada a la EA (Richartz *et al.*, 2005; Richartz-Salzbürger *et al.*, 2007). Además, observaciones clínicas demuestran que los pacientes con EA poseen una mayor susceptibilidad a infecciones (Beloosesky *et al.*, 2002), lo que apoyaría lo indicado sobre un deterioro inmunitario a nivel periférico.

Por otro lado, son muchos, y con resultados consensuados, los trabajos que abordan el estudio del desequilibrio oxidativo a nivel periférico que tiene lugar en la EA. Está ampliamente demostrada la existencia de daño oxidativo en sangre periférica, ya desde estadios tempranos de la enfermedad (Schrage *et al.*, 2013), lo que podría ser un reflejo de los cambios que, en el aspecto oxidativo, ocurren en el sistema nervioso central (Straface *et al.*, 2005). En células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con EA, se ha descrito un aumento en la cantidad de radicales libres (Leutner *et al.*, 2005), del daño al ADN (Mórocz *et al.*, 2002; Kadioglu *et al.*, 2004; Migliore *et al.*, 2005), de mayores niveles de oxidación proteica y lipídica en las mitocondrias (Sultana *et al.*, 2011), y de un aumento de apoptosis y disfunción mitocondrial (Leuner *et al.*, 2012). A su vez, se ha observado una disminución temprana de defensas antioxidantes, tanto enzimáticas como no enzimáticas, en plasma y eritrocitos (Rinaldi *et al.*, 2003). Sin embargo, la bibliografía sobre los niveles de compuestos antioxidantes en leucocitos de sangre periférica es escasa. Cabe destacar la amplia literatura existente sobre la desregulación en la homeostasis del glutatión y la alteración en la actividad de las enzimas dependientes de su ciclo en la EA tanto en el cerebro (Lee *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2012) como a nivel periférico. Así, muchos autores apuntan a una disminución de los niveles de glutatión total, del GSH y de la relación GSH/GSSG en plasma (Calabrese *et al.*, 2006; Bermejo *et al.*, 2008; Puertas *et al.*, 2012) y eritrocitos (Kosenko *et al.*, 2012), y a un aumento de GSSG en esas mismas localizaciones (Calabrese *et al.*, 2006; Baldeiras *et al.*, 2008). En cuanto a la actividad de la enzima antioxidante catalasa, algunos autores proponen una disminución de su actividad en plasma

(Puertas *et al.*, 2012) y eritrocitos (Kharrazi *et al.*, 2008), mientras que otros observan un aumento en los hematíes (Torres *et al.*, 2011). Tal y como se acaba de comentar, los datos sobre las defensas antioxidantes en leucocitos es prácticamente inexistente, si bien cabe esperar que se encuentren disminuidos debido al alto estrés oxidativo que presentan, tal y como fue observado por Buizza y colaboradores (2012).

Es un hecho ampliamente aceptado que el mayor factor de riesgo de padecer EA es la edad avanzada (Halagappa *et al.*, 2007). En el envejecimiento tiene lugar toda una serie de modificaciones y alteraciones que podrían contribuir a la aparición y progresión de la EA, como el aumento del estrés oxidativo (Kawamoto *et al.*, 2005), la disfunción, asociada a la senescencia, de la microglía, astrocitos y células endoteliales cerebrovasculares (von Bernhardt, 2007; Malavolta *et al.*, 2013), la disminución de enzimas antioxidantes de la corteza cerebral y el hipocampo (Venkateshappa *et al.*, 2012), y el fallo en los sistemas de eliminación de tóxicos (Ihara *et al.*, 2013). Además, la presencia de “inflamm-aging” ha sido propuesta en un estadio prodrómico de la EA (Giunta *et al.*, 2008). Otro factor que aumenta el riesgo de padecer EA es el síndrome metabólico (Frisardi *et al.*, 2010), y concretamente la obesidad y la diabetes (Proffeno *et al.*, 2010). Los pacientes con EA son más vulnerables a padecer diabetes tipo II (Janson *et al.*, 2004), ya que poseen una resistencia a la insulina en el cerebro debido a la acción deletérea de los oligómeros de A $\beta$  sobre la funcionalidad de los receptores de insulina (Rauk, 2008; Talbot *et al.*, 2012). Además, con la edad, la densidad de receptores de insulina disminuye en el cerebro (Bosco *et al.*, 2011). Se ha sugerido una menor utilización de la glucosa en el cerebro con EA, un signo temprano de la enfermedad, como una adaptación metabólica al estrés oxidativo, en la que tiene lugar una disminución de la glicolisis a favor del metabolismo de las pentosa fosfatos con el fin de generar NADPH y glutatión (Mamelak, 2012). Así, debido a la alteración neuroendocrina observada, algunos autores se han referido a esta enfermedad como diabetes de tipo III (De la Monte y Wands, 2008).

Así, probablemente debido a la estrecha relación de la EA con una elevada oxidación y una inflamación exacerbada, además de con numerosas patologías, los pacientes con EA muestran una disminución de la esperanza de vida (Hölscher, 1998; Brodaty *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013), observando una reducción de su supervivencia media tras el diagnóstico (Larson *et al.*, 2004). En concreto, en el modelo murino empleado en el presente estudio,

nuestro grupo de investigación observó una menor esperanza de vida media en los 3xTgAD en relación a los animales control NTg (Mate *et al.*, 2014a).

Con todo lo indicado el estudio, en modelos animales de EA, de la función inmunitaria a nivel periférico así como del estado redox en los leucocitos se muestra de gran interés, no sólo por el efecto que pueda ejercer esta enfermedad sobre el sistema inmunitario, sino también porque el alcance de tales efectos podrían ser dependientes de la gravedad de la enfermedad.



# Justificación y Objetivos





Si bien se encuentra ampliamente aceptado que con el envejecimiento existe una remodelación del sistema inmunitario, que conlleva un aumento de la susceptibilidad y severidad de infecciones así como de la incidencia de fenómenos autoinmunes y cáncer, son innumerables los resultados controvertidos expuestos en la literatura científica sobre la inmunosenescencia, especialmente en lo referente a la inmunidad innata y a la desregulación que tiene lugar en los niveles de citoquinas, con papeles centrales en dicho sistema y en el envejecimiento. Por otro lado, están muy poco caracterizados los cambios que experimentan con el envejecimiento fisiológico los parámetros relacionados con el estrés oxidativo de las células inmunitarias, aspecto de especial interés debido a la estrecha relación entre la oxidación y el deterioro funcional de esas células. Además, son pocos los trabajos que analizan a hombres y mujeres separadamente, especialmente en lo que a la funcionalidad de las células inmunitarias se refiere, perdiendo, así, la posibilidad de conocer el efecto del factor *género* sobre la inmunosenescencia. En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha estudiado una amplia batería de parámetros de capacidad funcional del sistema inmunitario, los cuales, tras un análisis preliminar en hombres y mujeres a lo largo de su envejecimiento y posteriormente utilizando ratones y personas centenarias, han sido propuestos como indicadores de salud y longevidad, sugiriéndolos como marcadores de edad biológica. Sin embargo, hasta el momento no se ha llegado a caracterizar el comportamiento de dichos parámetros a lo largo de las distintas edades del envejecimiento humano en una amplia población. Además, se hace necesaria la búsqueda de nuevos parámetros relacionados con la función inmunitaria, como la secreción de citoquinas, y con la oxidación e inflamación, empleando diferentes tipos de muestras de sangre periférica, comprobando si pueden ser utilizados como marcadores de salud y edad biológica. Esto permitiría también profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la inmunosenescencia. Por lo tanto, el objetivo de este primer apartado ha sido:

- 1. Analizar una serie de funciones así como diversos parámetros de inflamación y oxidación en las células inmunitarias de sangre periférica, en el sobrenadante de cultivos de leucocitos y en el plasma de una amplia muestra de hombres y mujeres de edad adulta, adulta-madura y madura.**

Los ritmos biológicos confieren una estructura temporal coherente a la fisiología del organismo y son esenciales para su adecuado funcionamiento. Así, en función de la hora del día y el momento del año los sistemas reguladores, el nervioso, el endocrino y el inmunitario muestran variaciones en sus neurotransmisores, hormonas y mediadores inmunológicos. Con la edad, tales ritmos se deterioran provocando, consecuentemente, toda una serie de alteraciones que afectan a la salud y al bienestar del organismo. En este sentido, pese a que son bastante numerosos los estudios que abordan los ritmos circadianos del sistema inmunitario, son casi inexistentes los estudios que lo consideran desde el punto de vista del envejecimiento. Además, son escasos los trabajos que analizan las variaciones circanuales en humanos, y prácticamente ninguno lo examina desde la perspectiva de la inmunosenescencia. Es más, ninguno de los trabajos sobre cronobiología presentes en la bibliografía se estudia, en el mismo grupo de sujetos, una batería de parámetros funcionales de las células inmunitarias de sangre periférica humana. Por lo tanto, el segundo objetivo de la presente tesis ha sido:

**2. Estudiar los efectos de los ritmos circadianos y circanuales en una serie de características del sistema inmunitario humano, así como el impacto del envejecimiento sobre tales efectos.**

Este objetivo está constituido por dos sub-objetivos: **2a. Analizar una serie de funciones de leucocitos de sangre periférica en dos horas distintas del día en individuos jóvenes y septuagenarios. 2b. Analizar diversas capacidades funcionales de leucocitos de sangre periférica a lo largo de las distintas estaciones del año en sujetos adultos y maduros.**

En las últimas dos décadas, los centenarios han sido ampliamente estudiados como el mejor modelo a la hora de analizar el envejecimiento saludable. Estos sujetos estarían equipados de eficientes mecanismos inmunitarios y de un equilibrado estado redox, aspecto que sería responsable, al menos en parte, de la elevada longevidad que alcanzan. Los nonagenarios, sin embargo, no han sido tan ampliamente estudiados en este aspecto, y si bien existen algunos trabajos que sugieren un sistema inmunitario relativamente inalterado, son pocos los que abordan el análisis de los niveles de citoquinas en estos individuos, y

menos aún si las mismas han sido valoradas en distintas muestras biológicas. En la literatura, la evolución de una misma citoquina con el envejecimiento es controvertida. En este sentido, el origen de las discrepancias puede deberse, entre otras razones, al tipo de muestra biológica estudiada. Así, la valoración de una determinada citoquina en distintos contextos fisiológicos (presencia/ausencia de ciertos tipos de células inmunitarias, tipo de mitógeno,...) permitiría conocer, no sólo su comportamiento con el envejecimiento, sino también la posible fuente celular principal de su procedencia. Por otro lado, en la mayoría de los estudios con personas longevas los participantes son prioritariamente mujeres, debido probablemente, al mayor porcentaje de mujeres que rondan los 100 años, lo que da como resultado la inexistencia de trabajos sobre la función del sistema inmunitario que analicen separadamente hombres y mujeres. Dado que nuestro grupo de investigación ha establecido una serie de funciones inmunitarias como marcadores de velocidad de envejecimiento y predictores de longevidad, y que ha comprobado que los individuos centenarios las mantienen en condiciones similares a los adultos sanos, el análisis de estos parámetros en personas nonagenarias, tanto hombres como mujeres, permitiría conocer si estos individuos, al igual que los centenarios, mantienen también una funcionalidad del sistema inmunitario preservada. Por lo tanto, el tercer objetivo planteado ha sido:

**3. Caracterizar diversos parámetros de función inmunitaria y de defensa antioxidante en una población de hombres y mujeres nonagenarios, como posible modelo de envejecimiento saludable.**

Este objetivo a su vez fue subdividido en los siguientes dos sub-objetivos: **3a. Analizar una serie de funciones en neutrófilos y linfocitos de sangre periférica, valoración de citoquinas en varios tipos de muestras, y de defensas antioxidantes en plasma de hombres y mujeres nonagenarios, en relación a sujetos adultos y maduros. 3b. Valorar los niveles de diversas citoquinas en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares estimuladas con PHA, en el plasma procedente de sangre estimulada previamente en ausencia/presencia de LPS, y en el plasma de hombres y mujeres nonagenarios en comparación con personas adultas y septuagenarias.**

Cada vez son más las evidencias de que el estrés oxidativo no sólo se encuentra íntimamente ligado al envejecimiento y a la inflamación, sino que también está asociado con la patogénesis de numerosas afecciones, como la diabetes, la obesidad, la hipertensión, las enfermedades neurodegenerativas, las cardiovasculares y el cáncer. En base a esto, el estrés oxidativo podría considerarse como la “vía final común” a través de la cual los factores de riesgo de varias enfermedades ejercen sus efectos deletéreos. Si bien la fragilidad no es una enfermedad como tal, se encuentra estrechamente ligada con el deterioro funcional y la presencia de diversas patologías, alteraciones que provocarían, si cabe, una mayor desregulación de la homeostasis, al afectar a los sistemas reguladores, el nervioso, el endocrino y el inmunitario, especialmente al avanzar la edad. En este sentido, el estudio Toledo para un Envejecimiento Saludable (ETES), desde un enfoque de investigación básica y clínica, lleva varios años analizando una cohorte de personas mayores de 65 años con el fin de caracterizar, en el más amplio sentido de la palabra, el fenotipo frágil. Dado que el estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos implicados en el desarrollo de la fragilidad, la posible relación existente entre parámetros de oxidación y de defensas antioxidantes y la fragilidad, así como con otras discapacidades funcionales y patologías, podría dar lugar al hallazgo de marcadores que reflejen el deterioro de la reserva homeostática al avanzar la edad. Por lo tanto, el quinto objetivo de la presente tesis ha sido:

**4. Analizar los niveles de antioxidantes totales plasmáticos en una amplia población de personas mayores de 65 años pertenecientes al Estudio Toledo para un Envejecimiento Saludable con el fin de establecer posibles correlaciones entre la cantidad de tales antioxidantes y diversas características y patologías que se encuentran asociados con el envejecimiento y/o la fragilidad.**

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), una de las pocas afecciones cuya mortalidad sigue aumentando en la población mundial, cursa con altos grados de inflamación y estrés oxidativo no sólo a nivel pulmonar, sino también general, hecho que ha llevado a proponerla como una enfermedad sistémica. De hecho los trabajos llevados a cabo en leucocitos periféricos indican que la inflamación/oxidación del pulmón se refleja en la circulación sanguínea. Sin embargo, son pocos los estudios que comparan la alteración del

sistema inmunitario entre los distintos grados de la enfermedad, y ninguno de ellos analiza la capacidad de secreción de citoquinas por los leucocitos periféricos de los enfermos, ni tampoco el contenido de defensas antioxidantes en dichas células. Dado que los pacientes con EPOC muestran un marcado deterioro de la salud y mayores niveles de discapacidad y mortalidad, la valoración de una batería de parámetros de función inmunitaria, marcadores de velocidad de envejecimiento y longevidad, y de defensas antioxidantes, podría revelar un sistema inmunitario más envejecido en relación a las personas sanas de la misma edad cronológica. Además, al poder analizar tales parámetros en personas con distinta gravedad de EPOC se podría conocer si el grado de la enfermedad incide de forma significativa en tales parámetros y por tanto cuáles de ellos podrían servir de marcadores de inicio y/o desarrollo de la patología. Por lo tanto, el cuarto objetivo de la presente tesis ha sido:

**5. Analizar diversos parámetros de funcionalidad de leucocitos de sangre periférica, incluyendo niveles de citoquinas, y de defensa antioxidante en un grupo de hombres con EPOC de grado moderado y severo en comparación con sujetos sanos de la misma edad cronológica, para poder establecer a los pacientes con EPOC como un posible modelo de envejecimiento prematuro asociado a una patología, además de detectar posibles marcadores del desarrollo de la enfermedad.**

Debido al aumento de la esperanza de vida y al envejecimiento de la población, la incidencia de enfermedades neurodegenerativas, y especialmente de la enfermedad de Alzheimer (EA) está aumentando significativamente en las últimas décadas, incremento que continuará dándose a menos que se encuentre un tratamiento o una medida preventiva efectiva. Sin embargo, el estudio de la EA presenta limitaciones y complicaciones, en cuanto a la obtención de muestras humanas y a que las manifestaciones clínicas suelen aparecer cuando la enfermedad se encuentra ya bastante avanzada. El desarrollo de modelos animales, como el del triple transgénico (3xTgAD) que mimetiza la fisiopatología que tiene lugar en el cerebro humano, ha permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la EA. Además, cada vez son más las pruebas de que esta patología va acompañada de una alteración sistémica. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha comprobado un deterioro de la función inmunitaria y elevados niveles de

estrés oxidativo en timo y bazo de ratones 3xTgAD. De hecho, la comunicación bidireccional existente entre el sistema nervioso y el sistema inmunológico, que se establece tanto a nivel central como periférico, podría proporcionar marcadores periféricos que reflejen la aparición y la progresión del Alzheimer. Además, no está del todo claro si con la EA existe una sobreactivación del sistema inmunitario periférico, o por el contrario tiene lugar un declive general de las respuestas inmunológicas. Por lo tanto, el estudio del sistema inmunológico y de parámetros de estrés oxidativo, a un nivel periférico y de manera longitudinal en los 3xTgAD, podría permitir encontrar posibles marcadores del desarrollo de la EA, incluso en estadios prodrómicos de la misma. Dado que ciertas funciones inmunitarias son marcadoras del grado de envejecimiento y de longevidad, su análisis permitiría conocer si los individuos con Alzheimer muestran una inmunosenescencia prematura en relación a los sujetos sanos de la misma edad cronológica. Por lo tanto, el sexto objetivo de esta tesis ha sido:

**6. Analizar, en un modelo murino triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer, mediante un estudio longitudinal iniciado a edades tempranas, los cambios en diversos parámetros funcionales y de estrés oxidativo en leucocitos peritoneales, así como relacionarlos con la longevidad.**

# Material y Métodos





### **3.1. MATERIAL**

#### **3.1.1. Material biológico**

##### **3.1.1.1. Humanos**

La información sobre los detalles y las características, sexos y edades de los sujetos humanos empleados en cada experimento realizado a lo largo de la presente tesis se recoge en el apartado 3.2.1. “Protocolos experimentales en humanos”. En todos esos protocolos, los participantes recibieron información acerca del propósito del estudio y dieron su consentimiento por escrito, antes del inicio de cualquier procedimiento relativo al estudio. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los principios descritos en la Declaración de Helsinki.

##### **3.1.1.2. Animales**

Se emplearon ratones *Mus musculus* de la cepa 129/C57BL6, tanto salvajes (no transgénicos, NTg) como triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTgAD), cuyas características, sexo y edad se detallan en el apartado 3.2.2. que recoge la información sobre el protocolo experimental en ratones. Todos los animales fueron cedidos por el laboratorio de la Dra. Lydia Gimenez-LLort del Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal del Instituto de Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona. Dicha experimentación se llevó a cabo siguiendo las directrices dictadas en el Real Decreto 1201/2005 del 21 de Octubre de 2005 (BOE nº 252) acerca de la protección de animales para uso experimental.

Todos los ratones fueron mantenidos en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid) en condiciones estándar de alimentación con pienso (dieta A04 de PANLAB) y agua *ad libitum*, a una temperatura constante de 22±2 °C y fotoperiodo invertido (12 h luz: 12 h oscuridad, con cambio horario a las 8:00h). El mantenimiento de estas condiciones fue comprobado diariamente.

### 3.1.1.3. Líneas celulares

Como células dianas para valorar la actividad *Natural killer* de los linfocitos de sangre periférica humana se emplearon las de la línea mieloblástica K562, procedente de un linfoma humano. Por su parte, para la valoración de esta misma función en leucocitos peritoneales de ratón se utilizaron como células diana las de la línea YAC-1 procedente de un linfoma murino de células T inducido por el virus de Moloney. Ambas fueron cedidas por el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico de Madrid y mantenidas a -80 °C hasta su utilización en condiciones de esterilidad y en alícuotas de  $2-3 \times 10^6$  células/ml de medio completo (RPMI 1649 con gentamicina al 1%, y suplementado con 10% de suero fetal de ternera descomplementarizado) y 10% de DMSO, como agente crioprotector. Para la descongelación y cultivo de las mismas, se realizan dos lavados consecutivos mediante centrifugación a 1020 g en frío; el primero durante 5 min para quitar el DMSO presente en la muestra, y el segundo durante 10 min. Tras comprobar su viabilidad mediante el método de exclusión del colorante vital azul tripán, que se detalla en el apartado 3.3.1.1., se procede a su cultivo con medio completo en frascos estériles mantenidos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, con atmosfera saturada de humedad.

### 3.1.2. Medios de cultivo y soluciones salinas

#### 3.1.2.1. Soluciones salinas preparadas en el laboratorio con agua ultrapura

- Solución salina tamponada con fosfatos (PBS). Su composición por litro de agua ultrapura es la siguiente: cloruro sódico (NaCl) 123,2 mM (PANREAC); fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 10,84 mM (PANREAC) y fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 3,23 mM (PANREAC). Se ajusta el pH a 7,4, se esteriliza en autoclave durante 1 h a 1 atmosfera de presión y 120 °C. Se almacena a 4 °C.
- Solución salina balanceada de Hank. Su composición por litro de agua ultrapura es: D(+)-Glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) 5,55 mM (PANREAC); cloruro magnésico (MgCl<sub>2</sub>) 1 mM (PANREAC); cloruro sódico (NaCl) 136,89 mM (PANREAC); cloruro potásico (KCl) 5,36 mM (PANREAC); cloruro cálcico (CaCl<sub>2</sub>) 1,26 mM (PANREAC); fosfato magnésico (MgHPO<sub>4</sub>) 0,80 mM (PANREAC); fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,44 mM (PANREAC); fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,42 mM (PANREAC); bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) 4,16 mM (PANREAC). Se ajusta el pH a 7,4, se esteriliza mediante filtración a través de una membrana de 0,22 µm de diámetro de poro (MILLIPORE). Se almacena a 4°C.
- Tampón fosfato 50 mM. Su composición por litro de agua destilada es: Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 50 mM (PANREAC) y fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 63 mM (PANREAC). En relación 1:1,5. Se ajusta el pH a 7,4.

- Tampón fosfato 0,1 M con EDTA. Su composición por litro de agua destilada es: Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ): 0,1 M (PANREAC) y EDTA 5 mM. Se ajusta el pH a 8.

### 3.1.2.2. Medios comerciales

- RPMI 1640 con L-glutamina (20mM) y HEPES (25mM) (PAA) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (SFT) (PAA) (descomplementarizado mediante calentamiento en baño a 56 °C durante 30 min) y gentamicina al 1% v/v (0,1 mg/ml) (PAA). También llamado medio completo.
- RPMI 1640 sin L-Glutamina y con Hepes (25mM) (PAA).
- RPMI 1640 con L-Glutamina y sin rojo fenol (PAA).

Estos medios se suministran en condiciones estériles y se conservan a 2-8°C.

### 3.1.3. Reactivos y kits comerciales

- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (SIGMA-ALDRICH).
- Ácido clorhídrico al 37% (HCl) (PANREAC). Se emplea a una concentración de 0,5 N.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (SIGMA-ALDRICH).
- Ácido perclórico al 60 % ( $\text{HClO}_4$ ) (SIGMA-ALDRICH).
- Ácido sulfúrico para HPLC ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (SIGMA-ALDRICH).
- Ácido tricloroacético 20% p/v (TCA,  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) (PANREAC).
- Agua destilada y ultrapura (MILLIPORE).
- Albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA-ALDRICH).
- Anticuerpos monoclonales anti-CD45 conjugado con PerCP; anti-CD11b, anti-CD19, anti-CD4 y anti-CD8 conjugados con FITC; anti-CD335, anti-CD5 y anti-CD45RA conjugados con PE; anti-CD25 conjugado con PerCP-cianina; anti-CD3 conjugado con APC (BD Biosciences).
- Azul de nitrotetrazolio (NBT) (SIGMA-ALDRICH). En el momento de su utilización, se reconstituye con solución de Hank para obtener una concentración de 1 mg/ml. Se conserva a 4 °C en oscuridad.
- Azul tripán, solución al 0,4% (SIGMA-ALDRICH).
- Azur-Eosina-Azul de Metileno, solución según GIEMSA (PANREAC).
- Bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) (PANREAC).
- Cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) (PANREAC).
- Cloruro magnésico ( $\text{MgCl}_2$ ) (PANREAC).
- Cloruro potásico (KCl) (PANREAC).
- Cloruro sódico (NaCl) (PANREAC).

- D(+)-Glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (PANREAC).
- Dimetilsulfóxido secado (DMSO) (MERCK).
- 1,4-Dioxano (MERCK).
- ELISA para valorar niveles de IL-6 (R&D SYSTEMS).
- ELISA para valorar niveles de IL-8 (R&D SYSTEMS).
- ELISA para valorar niveles de IL-10 (DIACLONE).
- ELISA para valorar niveles de sIL-6R (R&D SYSTEMS).
- ELISA para valorar niveles de TNF-α (R&D SYSTEMS).
- ELISA para valorar el receptor soluble I y II de TNF (sTNF-RI y -RII) (HYCULT BIOTECHNOLOGY).
- Etanol (PANREAC).
- Fitohemaglutinina (PHA) procedente de *Phaseolus Vulgaris* (SIGMA-ALDRICH). Se prepara una solución de 250 µg/ml de concentración en PBS, se alícuota y se conserva a -20°C hasta su uso. La concentración final en el pocillo es de 12,5 µg/ml.
- Fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (PANREAC).
- Fosfato magnésico (MgHPO<sub>4</sub>) (PANREAC).
- Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (PANREAC).
- Gentamicina (10mg/ml) (PAA).
- Glutación oxidado (GSSG) (SIGMA-ALDRICH).
- Glutación reducido (GSH) (SIGMA-ALDRICH).
- Glutación reductasa (GR) (SIGMA-ALDRICH).
- Hidróxido sódico (NaOH) (PANREAC).
- Histopaque de densidad 1,077 g/ml (SIGMA-ALDRICH). Se conserva a 2-8 °C en oscuridad.
- Histopaque de densidad 1,119 g/ml (SIGMA-ALDRICH). Se conserva a 2-8 °C en oscuridad.
- Kit ácido bicinconínico (BCA) (SIGMA-ALDRICH).
- Kit colorimétrico para valorar actividad citotóxica (PROMEGA).
- Kit colorimétrico para valorar la capacidad antioxidante total (NANJING JIANCHENG BIOENGINEERING INSTITUTE).
- kit fluorométrico para valorar la actividad xantina oxidasa “Amplex Red Xantina / Xantina oxidasa” (INVITROGEN).
- Kit para valorar 6 citoquinas humanas por luminometría mediante MULTIPLEX “Milliplex Map” (MILLIPORE).
- Kit para valorar 8-isoprostano (CAYMAN).
- Kit para valorar PCR mediante nefelometría (SIEMENS).
- Lipopolisacárido (LPS) (SIGMA). Para la obtención del plasma procedente de sangre estimulada con LPS, se prepara una solución de 10 µg/ml en PBS, se alícuota y se conserva a -20°C hasta su uso. La concentración final en el ensayo es de 0,25 µg/ml por tubo eppendorf. Por el contrario, para la obtención del sobrenadante de cultivo

de células peritoneales de ratón, se prepara una solución de 100 µg/ml de concentración en PBS, se alícuota y se conserva a -20°C hasta su uso. La concentración final en el pocillo es de 1 µg/ml.

- Líquido de centelleo (MP).
- Metanol (PANREAC).
- N-etilmaleimida (NEM) (SIGMA-ALDRICH).
- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida (NADPH) (SIGMA-ALDRICH).
- O-ftalaldehído (OPT) (SIGMA-ALDRICH).
- Partículas de látex, poliestireno (SIGMA-ALDRICH), de 1,1 µm de diámetro. Se preparan al 1% en PBS. La concentración final en el ensayo es de 0,1% de partículas por ml.
- Péptido formilado (N-Formyl-Met-Leu-Phe; fMLP) de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH), reconstituido en PBS ( $10^{-2}$  M), alicuotado y conservado a -20 °C hasta su utilización. La concentración final en el ensayo es de  $10^{-8}$  M.
- Solución de Türk (MERCK).
- Suero fetal de ternera (SFT) (PAA). Se descomplementariza calentándolo en baño a 56°C durante 30 minutos y se congela alicuotado a -20°C hasta su utilización como componente del medio completo.
- Timidina tritiada ( $^3\text{H}$ -Timidina) (MP) con una actividad específica de 35 Ci/mmol, diluida a 0,1 mCi/ml en PBS estéril y almacenada a 4 °C.

#### 3.1.4. Material de laboratorio

- Cámaras de Boyden. Fabricadas de metacrilato, presentan dos compartimentos de 13 mm de diámetro externo, 9 mm de diámetro interno y 5 mm de altura cada uno.
- Columnas de adherencia; preparadas en pipeta Pasteur, en la que se empaquetan 50 mg de lana de nylon con una altura de 1,25 cm.
- Contador de células manual (REXEL).
- Cubetas de vidrio óptico y de cuarzo de 10 mm de paso óptico (HELLMA).
- Fibra de nylon (DU PONT).
- Filtros de nitrocelulosa (MILLIPORE). De 33 mm de diámetro y 0,22 µm de poro, para la esterilización de medios.
- Filtros de nitrocelulosa (MILLIPORE) transparentables de 13 mm de diámetro y 3 µm de poro, para las pruebas de quimiotaxis.
- *Flask* de cultivo (NUNC).
- Gradillas.
- Guantes.
- Hemocitómetro de Neubauer (BLAU BRAND).

- Materiales de plástico: jeringas y jeringuillas desechables, tubos, puntas de pipetas automáticas, vasos, eppendorfs, parafilm, etc.
- Material de vidrio: tubos, pipetas Pasteur, portaobjetos, cubreobjetos, probetas, vasos de precipitados, termómetros, etc.
- Papel de filtro para recoger células (SKATRON INSTRUMENTS).
- Pipetas automáticas y multidispensadoras (BOECO y GILSON).
- Pipeta de repetición Multipette plus (EPPENDORF).
- Placas de 96 pocillos con fondo plano transparentes (NUNC), y de fondo en U transparentes (NUNC).
- Placas de 96 pocillos negras y de fondo plano (NUNC).
- Placas MIF (KARTELL) de 8 pocillos (1,5 cm de diámetro).

La esterilización de material de efectúa en autoclave a 120 °C y 1 atmósfera de presión durante 1 hora. Para el material que no puede ser sometido a autoclave (pipetas automáticas, columnas de adherencia, etc.), se emplea luz ultravioleta durante 20 minutos antes de su utilización.

### **3.1.5. Aparataje**

- Agitador de tubos (BUNSEN) y de placas (LABNET).
- Agitador magnético (BOECO).
- Autoclave (SELECTA).
- Balanzas de precisión (METTLER TOLEDO y BOECO).
- Baño con sonicación (BRANSON 200).
- Baño termostatzado con agitación (MEMMERT).
- Bomba de filtración (MILLIPORE).
- Cabina de flujo laminar vertical AV-100 (TELSTAR).
- Centrífugas con refrigeración para tubos de vidrio de calibre dieciocho y eppendorfs (HERAEUS; HETTICH ZENTRIFUGEN).
- Citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).
- Congelador de -20 °C (LIEBHERR) y de -80°C (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC y THERMO SCIENTIFIC).
- Contador beta (PERKIN-ELMER).
- Destilador de agua y agua ultrapura (MILLIPORE).
- Dispensador de hielo picado (SCOTSMAN).
- Espectrofotómetro (THERMO SPECTRONIC).
- Espectrofotómetro y Fluorímetro de placas (BMG).
- Frigoríficos de 4 °C (FAGOR y LYNX).
- Granatario (PRECISA INSTRUMENTS).

- HPLC 2690 Alliance con detector array de diodos 996 (WATERS) y columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) (BioRad).
- Incubadoras termostatzadas con atmósfera saturada de humedad y de CO<sub>2</sub> regulable (SELECTA y HERAEUS).
- Luminómetro (Luminex 200™, LUMINEX XMAP™ TECHNOLOGY).
- Microscopio invertido (PLEUGER).
- Microscopio óptico (NIKON).
- Nefelómetro (BN ProSpec®, SIEMENS).
- pH-metro (XS INSTRUMENTS) con electrodo (HAMILTON).
- Recolector semiautomático de células (SKATRON INSTRUMENTS).
- Sistema de filtración por vacío (MILLIPORE).
- Sonicador (BANDELIN SONOPULS).

## **3.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES**

### **3.2.1. Protocolos experimentales en humanos**

#### **3.2.1.1. Estudio del efecto de la edad sobre la funcionalidad de células inmunitarias, el estado de inflamación y de estrés oxidativo en mujeres y hombres**

##### ***Parámetros analizados***

En este estudio se llevó a cabo la valoración de los parámetros que seguidamente se relacionan: En neutrófilos de sangre periférica: la capacidad de adherencia, de movilidad espontánea, de quimiotaxis, de fagocitosis, y la cantidad de anión superóxido. En linfocitos de esa misma localización: la de adherencia, de movilidad espontánea, de quimiotaxis, de proliferación, y la actividad NK. También se estudiaron los niveles de: 1) IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 en el sobrenadante de cultivo de linfocitos estimulados con PHA; 2) IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 en el plasma procedente de sangre estimulada previamente en ausencia/presencia de LPS; 3) sIL-6R, sTNF-RI y sTNF-RII en el plasma procedente de sangre estimulada previamente con LPS; y 4) PCR, IL-6, sIL-6R, IL-10, sTNF-RI y -RII en el plasma. Además, se valoró la cantidad intracelular de GSH y GSSG en neutrófilos y linfocitos, así como el glutatión total, la actividad xantina oxidasa, el ácido úrico, y el 8-isoprostano en el plasma. La capacidad antioxidante total se valoró tanto en el plasma como en las células sanguíneas.



## ***Participantes***

Para la realización de este trabajo experimental se partió de un total de 339 individuos voluntarios sanos, de población española, de ambos sexos y de edades comprendidas entre los 30 y los 79 años. Todos ellos procedían de distintas clínicas y centros de salud (Clínica Planas, CPM-Tejerina, Medicina del Trabajo de la Universidad Complutense de Madrid, Hospital Clínico San Carlos, Bayon Consulting Research and Development S.L., Novoclinic) que se encuentran dentro del contexto del contrato “Valoración del perfil inmunológico” de los Servicios Externos del Laboratorio de “Inmunología y Gerontología Experimental” del Departamento de Fisiología Animal II de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Los participantes se distribuyeron en 3 grupos experimentales en función de la edad, subdivididos según el sexo: El primer grupo de edad, los denominados “adultos”, estuvo constituido por 128 individuos de edades entre 30 y 49 años, de los cuales 63 fueron mujeres ( $44\pm 5$  años) y 65 varones ( $43\pm 5$  años). En el segundo grupo, los “adultos-maduros”, pertenecientes a la década de los 50 años, se incluyeron un total de 132 individuos, de los cuales 69 fueron mujeres ( $54\pm 3$  años) y 63 varones ( $55\pm 4$  años). Y por último, el grupo de “maduros” lo formaron un total de 79 individuos entre 60 y 79 años, y que también se dividió según el sexo en 42 mujeres ( $67\pm 6$  años) y 37 varones ( $66\pm 5$  años). Dada las características de la población estudiada, personas que recurren a clínicas *antiaging* y similares, arriba mencionadas, no fue aplicable ningún criterio de inclusión ni de exclusión, a excepción del sexo y la edad. Esto implica que se desconozcan características relevantes del estilo de vida de las personas analizadas. Sin embargo, consideramos que, debido a la amplitud de la muestra, la población estudiada puede reflejar relativamente bien a la población general. Además, hay que destacar que los sujetos valorados no mostraban ninguna patología relevante.

El estudio se realizó a partir de la sangre periférica procedente de la vena antecubital del brazo, la cual fue obtenida entre las 8:00 y las 10:00 de la mañana, con el fin de evitar posibles interferencias con los ritmos circadianos. Se recogieron 9 ml de muestra en tubos con citrato (BD).

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo según los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos redactados en la declaración de Helsinki.

### **3.2.1.2. Estudio del efecto de los ritmos biológicos sobre la funcionalidad de las células inmunitarias con el envejecimiento**

#### ***Parámetros analizados***

En este estudio, que se ha subdividido en los dos protocolos experimentales que se indican a continuación, se llevó a cabo la valoración de los siguientes parámetros: En neutrófilos de sangre periférica; la capacidad de adherencia, de quimiotaxis, de fagocitosis, y la cantidad de anión superóxido. En linfocitos de esa misma localización; la capacidad de adherencia, de quimiotaxis, de proliferación y la actividad NK.

#### **1) Estudio de los cambios en la funcionalidad de las células inmunitarias en dos horas distintas del día**

##### ***Participantes***

El estudio fue realizado en 10 personas de entre 70 y 79 años de edad (5 mujeres y 5 hombres;  $75 \pm 3$  años), procedentes de la Residencia La Alameda, ubicada en Torres de la Alameda (Madrid). Además se emplearon 7 personas jóvenes de 20-21 años (3 mujeres y 4 hombres), alumnos de fisioterapia de 2º y 3º curso de la Escuela Universitaria de Enfermería y Fisioterapia San Juan de Dios, integrada en la Universidad Pontificia Comillas. Todos los participantes, españoles y de raza caucásica, fueron reclutados por el fisioterapeuta y osteópata Prof. Carlos Carpintero.

Los criterios de inclusión consistieron en estar dentro de la edad requerida y encontrarse en buenas condiciones de salud. Los criterios de exclusión fueron aplicados en los casos en los que los sujetos referían enfermedades infecciosas o autoinmunes, alergias graves, inmunodeficiencias, neoplasias, fiebre reumática, enfermedades cardiovasculares, diabetes, desórdenes endocrinos y anemia. Tampoco se consideraron aquellos sujetos que se encontraban en tratamiento farmacológico, radioterapia o quimioterapia, los que eran fumadores o consumidores de alcohol o drogas, y los que habían realizado un entrenamiento de resistencia poco antes de su admisión. Considerando el hecho de que el momento del ciclo menstrual puede ejercer una fuerte influencia sobre la inmunidad, las

participantes jóvenes no se encontraban ni ovulando ni menstruando en el momento del estudio.

Todos los participantes recibieron información acerca del propósito del estudio y dieron su consentimiento por escrito para la utilización de sus muestras sanguíneas en investigación biomédica. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Se recogieron dos muestras sanguíneas (9 ml de sangre periférica tomados por punción venosa) de cada participante; la primera a las 10:00 h y la siguiente a las 15:00 h en tubos con citrato. Todas las tomas de muestra se realizaron en el mes de Febrero.

## **2) Estudio de los cambios en la funcionalidad de las células inmunitarias a lo largo de las distintas estaciones del año**

### ***Participantes***

Para el estudio de los cambios circunuales de las funciones inmunitarias, antes mencionadas, con el envejecimiento y la época del año, se reagruparon 217 de los participantes señalados en el apartado 3.2.1.1. En *adultos* (30-49 años;  $43 \pm 5$  años) se utilizaron 112, y en *maduros* (60-79 años;  $68 \pm 6$  años) 105, en función de la estación del año en el que fue valorada su muestra, y se unificaron los sexos. Las valoraciones llevadas a cabo entre marzo y mayo (ambos inclusive) se consideraron que pertenecían a la época estacional *primavera* (n=26-28 adultos y n=18-28 maduros); junio-agosto, *verano* (n=19-22 adultos y n=15-17 maduros); septiembre-noviembre, *otoño* (n=31 adultos y n=27-31 maduros); y diciembre-febrero, *invierno* (n=31 adultos y n=27-29 maduros).

## **3.2.1.3. Estudio de la funcionalidad de las células inmunitarias, la inflamación y el estrés oxidativo en una población nonagenaria como modelo de envejecimiento saludable**

### ***Parámetros analizados***

Para la realización de este estudio, se llevaron a cabo las siguientes valoraciones: En neutrófilos de sangre periférica; la capacidad de adherencia, de quimiotaxis, de fagocitosis, y el contenido de anión superóxido. En linfocitos de la misma localización; la de adherencia, de

quimiotaxis, de proliferación, y la actividad NK. También se estudiaron los niveles de IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 en: 1) el sobrenadante de cultivo de linfocitos estimulados con PHA; 2) el plasma procedente de sangre incubada previamente en ausencia/presencia de LPS; y 3) el plasma. Además, se valoraron los niveles plasmáticos de la PCR, el glutatión total y la capacidad antioxidante total.

### ***Participantes***

Se empleó un grupo aleatorizado de 35 ancianos de 90-99 años (26 mujeres y 9 hombres) ingresados en la residencia Los Nogales-Pacífico (Madrid) del programa “ENTRENO” (Efectos de un programa de **entrenamiento** de resistencia progresiva en **nonagenarios** sobre la capacidad funcional), bajo la coordinación y dirección de José Antonio Serra Rexach, Doctor en Medicina y Jefe del Servicio de Geriátría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Los criterios de inclusión fueron: 1) edad igual o mayor a 90 años, 2) poseer alguna capacidad de deambulación por mínima que sea, 3) aceptación escrita por parte del residente. Los criterios de exclusión fueron: 1) enfermedad terminal, 2) demencia severa que impida la realización de un programa de entrenamiento, 3) incapacidad para caminar, 4) infarto de miocardio en los seis meses previos, 5) cirugía por fractura de miembro inferior en 3 meses previos. Además, se emplearon dos grupos de 50 *adultos* (25 mujeres y 25 hombres) y 50 *maduros* (25 mujeres y 25 hombres) de edades comprendidas entre 30-49 años ( $43\pm 5$  años) y 60-79 años de edad ( $68\pm 6$  años), respectivamente. Los participantes de estos dos grupos de edad fueron individuos señalados en el apartado 3.2.1.1., cuyas muestras fueron procesadas en el mismo periodo de tiempo en el que fueron procesadas las muestras de los nonagenarios (Enero - Septiembre). Para la valoración de las citoquinas, el grupo de *maduros* perteneció únicamente a la edad septuagenaria (70-79 años).

Todos los participantes recibieron información acerca del propósito del estudio y dieron su consentimiento por escrito para la utilización de sus muestras sanguíneas en investigación biomédica. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Se obtuvieron 9 ml de sangre periférica por punción venosa de la vena antecubital, entre las 8:00 y las 10:00 de la mañana para evitar interferencias debidas a los ritmos circadianos.

### **3.2.1.4. Estudio de la relación entre la capacidad antioxidante total y diversos índices funcionales y estados patológicos en una población mayor de 65 años**

#### ***Parámetros analizados***

En este estudio se realizó la valoración de la capacidad antioxidante total en el plasma.

#### ***Participantes***

Se estudiaron un total de 1194 individuos, mayores de 65 años ( $76 \pm 6$  años), de los cuales 674 fueron mujeres ( $76 \pm 6$  años) y 520 hombres ( $75 \pm 6$  años), pertenecientes al "Estudio Toledo para un Envejecimiento Saludable" (ETES) integrado en la Red Temática de Investigación en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF). Los participantes de este estudio fueron personas institucionalizadas, así como integradas en la sociedad, todas ellas residentes en la provincia de Toledo. La selección de los sujetos fue realizada por un muestreo aleatorio del censo municipal de la provincia de Toledo, llevado a cabo de acuerdo con el sexo, la edad y el tamaño de la ciudad/población. La muestra del estudio abarcó el 24% de la población de 65 o más años de edad que procedían de dicha provincia.

Todos los participantes firmaron el consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de Toledo.

Los cuestionarios y las extracciones de sangre periférica de la vena antecubital, y la posterior obtención del plasma por centrifugación, fueron llevados a cabo por personal cualificado, bajo la supervisión del Dr. Francisco José García García, coordinador del estudio antes mencionado, del departamento de Medicina Geriátrica del Hospital Virgen del Valle de Toledo. La selección de los participantes y la recopilación de los datos fueron realizadas desde Junio del 2006 hasta Septiembre del 2009.

Los valores de la capacidad antioxidante total fueron analizados en relación a toda una serie de variables presentes en una base de datos del mismo estudio. Estas variables fueron: 1) la *edad*, 2) el *sexo*, 3) la *fragilidad* (criterio de Fried; Fried *et al.*, 2001), 4) *actividades básicas* (índice de Katz; Katz *et al.*, 1963) e *instrumentales de la vida diaria* (índice de Lawton; Lawton y Brody, 1969), 5) *depresión* (Escala Geriátrica de Depresión, GDS; Yesavage, 1988), 6) *cognición* (Mini-Mental State Examination, MMSE; Folstein *et al.*, 1975), 7) *índice de masa corporal*, IMC ( $IMC = \text{peso} / (\text{talla})^2$  en  $\text{kg/m}^2$ ), 8) presencia o no de enfermedades cardiovasculares o aspectos relacionados con ellas, como 8a) *infarto de miocardio*, 8b)

*insuficiencia cardíaca, 8c) claudicación intermitente, 8d) angina de pecho, 8e) fibrilación auricular, 8f) hipertensión arterial, 8g) diabetes mellitus, 8h) valvulopatía, 8i) trombosis venosa profunda, 8j) embolia pulmonar, 8k) intervención en el corazón o en alguna arteria, 8l) colesterol alto, 8m) accidente cerebrovascular, y 8n) ataque isquémico transitorio (recuperado en menos de 24 horas).*

### ***Instrumentos***

Los distintos test y cuestionarios empleados sobre diversas características, estados funcionales y presencia/ausencia de patologías de los sujetos analizados en el presente estudio se encuentran en el anexo I.

### **3.2.1.5. Estudio de la funcionalidad de las células inmunitarias y las defensas antioxidantes en hombres con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)**

#### ***Parámetros analizados***

Los parámetros valorados en este estudio fueron los siguientes: En neutrófilos de sangre periférica; la capacidad de adherencia, de quimiotaxis, de fagocitosis, y el contenido de anión superóxido. En linfocitos de la misma localización; la de adherencia, de quimiotaxis, de proliferación, y la actividad NK. También se valoraron los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10 en el plasma procedente de sangre estimulada con LPS, los niveles intracelulares de glutatión total en neutrófilos y linfocitos, y la capacidad antioxidante total en plasma.

#### ***Participantes***

Con el fin de estudiar posibles cambios en la función inmunitaria en la EPOC, y si esos cambios dependen de la gravedad de la enfermedad, se analizaron 22 hombres de 50-69 años con EPOC ( $63 \pm 5$  años), de los cuales 15 mostraban el grado severo o grave de la enfermedad y 7 el grado moderado según la escala establecida por la Iniciativa Global de la EPOC (GOLD; del inglés, ***Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease***). Los criterios de inclusión fueron: 1) sujetos entre 50-69 años; 2) pacientes con EPOC estable y en el grado moderado ( **$80 \% > FEV_1 > 50 \%$**  del valor de referencia y  $FEV_1/FVC < 0,7$ ) o severo ( **$50 \% > FEV_1 > 30 \%$**  del valor de referencia y  $FEV_1/FVC < 0,7$ ) de la enfermedad según la GOLD. Los criterios de exclusión fueron: 1) pacientes en fase de reagudización o que hayan sufrido una reagudización en los últimos 3 meses; 2) pacientes con patología general severa,

enfermedades inmunes, cáncer, expectativa de vida < 1 años, bajo nivel de colaboración, demencia o alteración cognitiva, toma de productos que puedan interferir sobre el sistema inmunitario (vitaminas, fármacos o sustancias inmunoestimulantes, antioxidantes, antidepresivos,...). Además, como grupo control se emplearon 15 hombres sanos no fumadores de la misma edad cronológica, 50-69 años ( $59 \pm 6$  años), que presentaban unos valores óptimos de FEV<sub>1</sub> para su sexo y edad.

Todos los participantes fueron englobados dentro del estudio titulado “Valoración de la situación inmunológica de pacientes con EPOC” (código NAC-E-22) financiado por Zambon, S.A., proyecto que fue dirigido, a nivel clínico, por el Dr. José Luis Álvarez Sala del Departamento de Neumología del Hospital San Carlos (Madrid). El estudio fue aprobado por el “Comité Ético de Investigación Clínica” del Hospital San Carlos (Madrid).

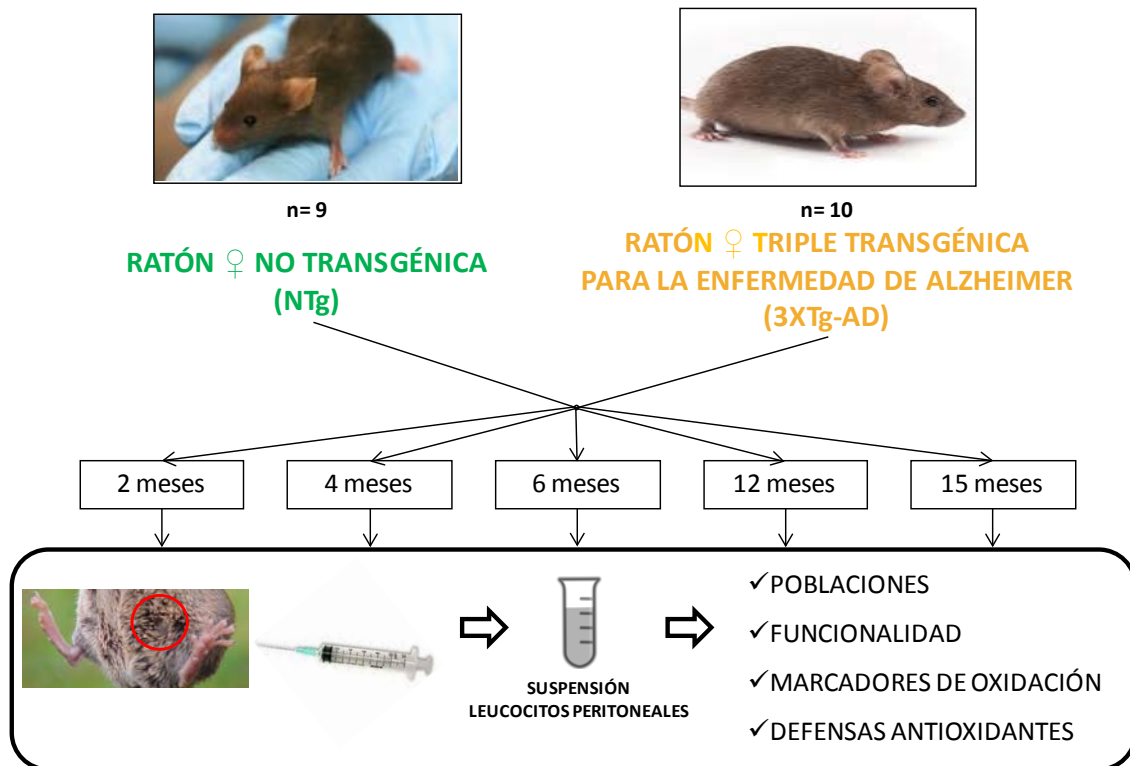
Tras la obtención del consentimiento informado de acuerdo con los requisitos de la regulación vigente, las GCPs (Buenas Prácticas Clínicas) y los principios éticos que tienen su origen en la Declaración de Helsinki, se extrajo una muestra de sangre periférica (9 ml) por punción venosa de la vena antecubital, entre las 8:00 y las 10:00 de la mañana para evitar interferencias debidas a los ritmos circadianos. Las tomas de muestras fueron realizadas a lo largo de todo un año (Enero - Diciembre).

### **3.2.2. Diseño en animales de experimentación: ratones**

#### **3.2.2.1. Estudio longitudinal de las poblaciones, funcionalidad y estado de estrés oxidativo de células inmunitarias peritoneales de ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer**

Se emplearon ratones hembra de la cepa 129/C57BL6, tanto salvajes (no transgénicas, NTg; n=9) como triple transgénicas para la enfermedad de Alzheimer (de la misma cepa salvaje, pero con los transgenes PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>Swe</sub> y tau<sub>P301L</sub>, 3xTgAD; n= 10), cedidos por el laboratorio de la Dra. Lydia Gimenez-LLort del Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal del Instituto de Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, a la edad de 1,5 meses. Todos los animales fueron mantenidos en grupos de 4-5 animales por jaula.

Con el fin de llevar a cabo el estudio longitudinal, se obtuvieron los leucocitos peritoneales de los ratones NTg y 3xTgAD a la edad de  $2\pm 1$ ,  $4\pm 1$ ,  $6\pm 1$ ,  $12\pm 1$  y  $15\pm 1$  meses (Fig. 7), entre las 8:00 y las 10:00 de la mañana, con el fin de evitar posibles interferencias con los ritmos circadianos. Los animales se dejaron tras la última toma en sus jaulas para el seguimiento de su longevidad.



**Figura 7. Ilustración del protocolo experimental diseñado para el estudio longitudinal de la cepa 129/C57BL6 no transgénicas (NTg) y triple transgénicas para la enfermedad de Alzheimer (3xTgAD).** Tras las tomas de muestra a la edad de  $2\pm 1$ ,  $4\pm 1$ ,  $6\pm 1$ ,  $12\pm 1$  y  $15\pm 1$  meses, se procedió al estudio de las poblaciones, funciones, marcadores de oxidación y defensas antioxidantes en las células inmunitarias peritoneales.

Al inicio de cada una de las tomas de muestra, los animales fueron pesados. Todos los ensayos dirigidos a valorar las subpoblaciones y la funcionalidad de las células inmunitarias se realizaron en muestras frescas. Así, además de las principales subpoblaciones de leucocitos peritoneales, se estudió la capacidad de quimiotaxis de macrófagos y linfocitos, la fagocitosis de macrófagos, la linfoproliferación basal y en presencia de los estímulos concanavalina A (ConA) y lipopolisacárido (LPS), y la actividad NK. Además, como marcadores de oxidación, se valoraron el contenido intracelular de glutatión oxidado (GSSG) y la actividad de la xantina oxidasa en los leucocitos. Las defensas antioxidantes



intraleucocitarias estudiadas fueron los niveles de glutatión reducido (GSH), y a la actividad de la enzima catalasa. Se anotó la fecha de muerte natural de cada ratón.

### **3.3. MÉTODOS**

#### **3.3.1. Métodos en muestras humanas de sangre periférica**

##### **3.3.1.1. Obtención de leucocitos, de plasma, de plasma de sangre periférica estimulada o no en presencia de LPS. Recuento y viabilidad celular**

**1) Extracción de sangre periférica:** A cada uno de los individuos de los distintos protocolos experimentales se les extrajo un total de 9 ml de sangre procedente de la vena antecubital del brazo mediante punción estéril. Las extracciones se realizaron a primera hora de la mañana, en ayunas y en situación de reposo previo, para evitar las variaciones circadianas, salvo en el *“Estudio de los cambios en la funcionalidad de las células inmunitarias en dos horas distintas del día”* especificado en la primera parte del apartado 3.2.1.2. La sangre fue dispensada en tubos estériles con citrato sódico como anticoagulante. El traslado de las muestras se realizó en camisas protectoras para mantenerlas a una temperatura aproximada de 4-7 °C. Se reservó a 4 °C un volumen de 3 ml de sangre que fue utilizado para los ensayos realizados en sangre total.

**2) Obtención del plasma:** Se centrifugó, a 4 °C, 1 ml de la muestra de sangre periférica durante 20 min a 940 g. Los sobrenadantes (plasmas) se guardaron en tubos eppendorf a – 20 °C hasta el momento de su utilización.

**3) Obtención de plasma procedente de sangre estimulada previamente o no con LPS:** Se realizó mediante un procedimiento descrito previamente (Hernanz *et al.*, 1996). Se diluyeron 500 µl de la muestra de sangre periférica (recogida en tubos de citrato) con 500 µl de medio RPMI 1640 sin glutamina en dos tubos eppendorf por cada individuo objeto de estudio. Seguidamente, se añadieron 10 µl de gentamicina (0,1 mg/ml en tubo) a ambos tubos. A continuación, a uno de ellos se añadieron 10 µl de LPS (0,25 µg/ml en tubo), mientras que en el otro fueron 10 µl de RPMI 1640 sin glutamina, como control de la muestra estimulada con LPS. Estos dos tipos de tubos se denominaron *plasma (+)LPS* y *plasma (-)LPS*,

respectivamente. Las mezclas se incubaron durante 4 h en estufa a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. Finalmente, los tubos eppendorf se centrifugaron 10 min a 900 g para eliminar las células. Los sobrenadantes fueron mantenidos a -20 °C hasta el momento de su utilización. Dichos sobrenadantes se emplearon para la valoración de diversas citoquinas y sus receptores.

**4) Obtención de leucocitos:** Se realizó siguiendo una técnica descrita previamente (De la Fuente *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008). Se procedió a la separación de las células sanguíneas mediante un gradiente de densidad. Para ello, en condiciones de esterilidad, se añadieron, en este orden, 3 ml de Histopaque de densidad 1.119, 3 ml de Histopaque de densidad 1.077 y 6 ml de sangre, en tubos de vidrio de calibre dieciocho. Su dispensación se realizó lentamente por las paredes del tubo para evitar que ambas sustancias se mezclasen entre sí. Los tubos se centrifugaron sin freno a 4 °C durante 30 minutos a 650 g. Así, los hematíes se quedan en el fondo del tubo, el plasma en la parte superior, y en la zona intermedia aparecen dos halos de células a distintos niveles; el superior constituido por leucocitos mononucleares (en su mayoría linfocitos), y el inferior por polimorfonucleares (PMNs; en su mayoría neutrófilos). A continuación, se extrajeron con pipetas Pasteur estériles cada uno de los halos, y se dispusieron en distintos tubos. Las células recién separadas se lavaron con PBS mediante una centrifugación a 4 °C durante 10 min a 400 g.

**5) Recuento celular:** Tras el lavado de las suspensiones celulares, conteniendo aproximadamente un 98% de neutrófilos o de linfocitos, y desechado el sobrenadante, los pellet celulares se resuspendieron en 900 µl de solución de Hank para los leucocitos PMNs neutrófilos y medio RPMI 1640 sin rojo fenol para los mononucleares. Las células se contabilizaron en cámaras de hemocitómetro de Neubauer mediante microscopio óptico y utilizando contadores de células manuales. Se calculó el número de células inmunológicas por ml.

**6) Viabilidad celular:** La viabilidad de las células utilizadas en los distintos ensayos se comprobó mediante el método de exclusión del colorante vital azul tripán en los momentos del recuento de las mismas. Este colorante, en solución al 0,4%, se añadió a una pequeña alícuota (10 µl) de las suspensiones celulares a partes iguales, 1:1 (v/v), e inmediatamente se contabilizaron en el hemocitómetro de Neubauer las células que aparecían teñidas de azul (muertas) y las que no se encontraban teñidas (vivas). El test de viabilidad del azul tripán se

hizo de forma rutinaria, y solamente se utilizaron las suspensiones celulares que superaron el 95% de viabilidad celular.

Para la valoración de las funciones inmunitarias, se empleó la muestra fresca de neutrófilos y linfocitos aislados. Por el contrario, los niveles intracelulares de GSSG, GSH y glutatión total en neutrófilos y linfocitos y la capacidad antioxidante total de las células sanguíneas se analizaron en células congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , tras su descongelación. Las muestras de neutrófilos y linfocitos se mantuvieron congeladas en pellets de  $10^6$  de células hasta su utilización.

Para la congelación de las células sanguíneas, se partió de 1 ml de sangre total que fue centrifugado a 1000 g durante 10 min, y desechado el plasma. A continuación, se añadió el mismo volumen de plasma retirado con RPMI sin rojo fenol y se procedió a su congelación hasta su utilización.

### **3.3.1.2. Estudio de las funciones en células inmunitarias**

La capacidad funcional de las **células fagocíticas** implica, además del proceso de la ingesta del material extraño, una serie de etapas que se desarrollan con anterioridad y que se continúan tras el mismo. Estas células se adhieren al endotelio como paso previo a la diapédesis, que les permite movilizarse hacia el foco infeccioso, dirigidas por un gradiente de moléculas atrayentes (quimiotaxis). Una vez en contacto con el material extraño, se unen a él, de forma espontánea o a través de factores séricos (opsoninas), y lo ingieren. A continuación, el material ingerido es destruido, digiriéndose mediante un proceso que, fundamentalmente, requiere actividad metabólica oxidativa y en el que se producen radicales libres de oxígeno, el primero de los cuales es el anión superóxido.

Los PMNs neutrófilos de la suspensión celular obtenida de sangre periférica se ajustaron a  $10^6$  PMNs neutrófilos/ml de solución Hank (De la Fuente *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008), a excepción del estudio de la capacidad de adherencia a endotelio, en el que se precisa la muestra de sangre completa.

En linfocitos, se analizó una de sus funciones más características, su capacidad proliferativa, y otras que son compartidas con las células fagocíticas, como son la capacidad de adherencia y la movilidad dirigida (quimiotaxis). Los linfocitos se adhieren a los endotelios

y recirculan por el organismo utilizando su capacidad de movilidad. Ambas actividades son previas y necesarias para que tenga lugar el reconocimiento antigénico que inicia la respuesta defensiva, y que se sigue fundamentalmente con la proliferación de los linfocitos activados. Además, junto con las células NK, los linfocitos T CD8+ y las células NKT realizan una importante función citotóxica.

Las suspensiones de leucocitos mononucleares obtenidas por gradiente de densidad de la sangre total, se dividieron en dos alícuotas. Una de ellas se ajustó en medio completo para el ensayo de la respuesta proliferativa. La segunda alícuota se ajustó en RPMI sin rojo fenol, para la valoración de la quimiotaxis y la actividad citotóxica *Natural Killer* (NK). En ambas, la concentración final de células fue de  $10^6$  linfocitos/ml (De la Fuente *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008).

Seguidamente se detalla la metodología empleada para el estudio de cada una de las etapas del proceso fagocítico en los PMNs neutrófilos y de las funciones mencionadas que se analizaron en los leucocitos mononucleares. Cada ensayo, correspondiente a un individuo y una toma de muestra, fue realizado por duplicado o triplicado.

### ***Capacidad de adherencia de los leucocitos***

Para analizar la capacidad de adherencia al endotelio vascular de los neutrófilos y los linfocitos de sangre periférica humana se utilizó el método de adherencia a fibra de nylon descrito por McGregor y colaboradores (1974) y modificado posteriormente por De la Fuente y colaboradores (1997). Mediante esta técnica se mide el porcentaje de células que, en un tiempo determinado, se adhieren a la superficie de la fibra de nylon empaquetada en columnas, hecho que reproduce *in vitro* la adherencia al endotelio que tiene lugar *in vivo* (Noga *et al.*, 1984).

En la muestra de sangre completa, se efectuó el recuento de neutrófilos y linfocitos mediante el hemocitómetro de Neubauer en microscopio óptico con el objetivo de 40 aumentos. Para ello, se tomaron 100 µl de sangre diluida al 50% con solución de Hank, y se le añadieron 900 µl de solución de Türk, que tiene la capacidad de lisar los hematíes y permite diferenciar la morfología de los leucocitos PMNs y mononucleares. Los resultados se expresaron como número de células por  $\text{mm}^3$ . Por otra parte, la mezcla formada por 500 µl

de sangre total y 500 µl de Hank (sangre diluida al 50% en solución de Hank) se hizo pasar por una columna de adherencia previamente preparada en pipeta Pasteur, dentro de la que se empaquetan, homogéneamente, 50 mg de lana de nylon con una altura aproximada de 1,25 cm. La pipeta se introdujo en un tubo de ensayo y se fijó con parafilm para que quedase perpendicular a la base sin tocar el vidrio. Pasados 10 min, el efluente cae en su totalidad por efecto de la gravedad, y se procedió al recuento de neutrófilos y linfocitos en dicho efluente, de forma similar a como se ha descrito previamente al paso por la columna de adherencia.

La diferencia entre el número de leucocitos presentes en la mezcla inicial y en el efluente, después de pasar por la columna de adherencia, da el número de los adheridos. El porcentaje de neutrófilos y linfocitos adheridos, que se expresó como Índice de Adherencia (IA), se calculó según la ecuación:

$$IA = [(leucocitos/mm^3_{\text{totales}} - leucocitos/mm^3_{\text{efluente}})/leucocitos/mm^3_{\text{totales}}] \times 100.$$

### ***Capacidad de movilidad inducida o quimiotaxis de los leucocitos***

La movilidad inducida o quimiotaxis de las células fagocíticas y de los linfocitos se evaluó siguiendo la técnica descrita por Boyden (1962) y posteriormente por Fontan y colaboradores (1976), ligeramente modificada por De la Fuente y colaboradores (1997), basada en que estos tipos celulares poseen la capacidad de desplazarse hacia un gradiente químico formado por un péptido formilado (fMLP), constituyente de la pared bacteriana (Snyderman y Pike, 1984; Schubert y Muller, 1989).

Se utilizaron cámaras de metacrilato, parecidas a las descritas por Boyden, con dos compartimentos (de 9 mm de diámetro interno y 13 mm de diámetro externo), separados por un filtro de nitrocelulosa de 3 µm de tamaño de poro. En el compartimento inferior se introdujo el agente quimioatrayente, esto es, alícuotas de 400 µl de fMLP a la concentración de  $10^{-8}$  M (Snyderman y Pike, 1984). En el superior se depositaron alícuotas de 300 µl de la suspensión celular ajustada a  $10^6$  PMNs neutrófilos/ml en solución de Hank o  $10^6$  linfocitos/ml en RPMI sin rojo fenol.

Las cámaras se incubaron durante 3 h a 37 °C en una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. Tras la incubación, los filtros, en los que han quedado retenidas las células que

han migrado hacia el gradiente creado por el quimioatrayente fueron recogidos, fijados y teñidos mediante el siguiente protocolo: 1) Alcohol metílico al 50% 5 min; 2) Alcohol etílico al 75% 5 min; 3) Agua ultrapura 2 min; 4) Azur-eosina-azul de metileno 45 min; 5) Lavado con agua ultrapura.

Posteriormente, los filtros se colocaron en portaobjetos con la cara inferior hacia arriba y se protegieron con cubreobjetos. Al microscopio con objetivo de inmersión (100x), se contabilizó el número de neutrófilos y de linfocitos que aparecieron en 20 campos tomados al azar de la cara inferior del filtro empleado en la cámara de Boyden. El valor obtenido en dichos recuentos se denomina Índice de Quimiotaxis (IQ).

### ***Capacidad de movilidad espontánea***

Para la valoración de la movilidad que podría darse de manera espontánea en PMNs neutrófilos y linfocitos, se empleó la técnica descrita por De la Fuente y colaboradores (1997; 1998). En vez de enfrentar los leucocitos a un agente quimioatrayente, se introdujeron 400 µl de solución de Hank en el compartimento inferior de la cámara de Boyden antes descrita. El procedimiento y el cálculo se realizó de manera similar a la utilizada para valorar la movilidad inducida o quimiotaxis.

### ***Capacidad de fagocitosis de los PMNs neutrófilos***

Esta función se valoró mediante la técnica descrita por De La Fuente (1985), ligeramente modificada posteriormente (De la Fuente *et al.*, 1997), con la que puede observarse la capacidad que tienen los neutrófilos de ingerir cuerpos extraños (bolas de látex).

En cada pocillo de placas MIF se dispensaron alícuotas de 200 µl de la suspensión celular de neutrófilos ajustados a  $10^6$  células/ml de solución de Hank y se incubaron a 37°C durante 30 min. Con ello se obtiene una monocapa de neutrófilos en el fondo del pocillo, que se lavó posteriormente con PBS atemperado a 37°C. Seguidamente, se añadieron 200 µl de solución de Hank y 20 µl de una suspensión de látex (1,091 µm de diámetro) al 1% en PBS y se incubaron a 37°C durante 30 min. A continuación, los pocillos se lavaron exhaustivamente con PBS a 37°C para arrastrar el látex que no hubiera sido fagocitado. Las células se fijaron

con metanol al 50% durante 4 min y se tiñeron con azur-eosina-azul de metileno durante 20-30 min. Finalmente, se lavó con abundante agua ultrapura para eliminar el exceso de colorante. Una vez secas las placas al aire, se procedió al recuento en el microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x), del número de partículas de látex ingeridas por 100 células tomadas al azar. El resultado se expresa como Índice de Fagocitosis (IF) y Eficacia Fagocítica (EF).

IF= número de bolas ingeridas en 100 PMNs neutrófilos.

EF (%)= (PMNs que han fagocitado al menos una partícula) x 100.

### ***Niveles de anión superóxido intracelulares en los PMNs neutrófilos***

Para conocer la capacidad de destrucción del material fagocitado por los PMNs neutrófilos, se valoraron los niveles de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Este radical libre es el primero de una cadena que se produce en el estadillo respiratorio, y que conduce a la digestión del material fagocitado (Babior, 1999). Se mide gracias a la gran capacidad de este anión para reducir compuestos como el azul de nitrotetrazolio (NBT), que es convertido, en proporción equimolar, en un formazán detectable por espectrofotometría (Bagasra *et al.*, 1988).

La prueba de reducción de NBT se llevó a cabo aplicando el método descrito por Hedley y Currie (1978), y modificado por De la Fuente y colaboradores (1997; 2008). En tubos de vidrio (0,5 cm de diámetro), se dispensaron alícuotas de 250  $\mu$ l de la suspensión celular de PMNs ajustados a  $10^6$  células/ml de solución de Hank, y se añadieron 250  $\mu$ l de NBT (1 mg/ml en Hank). Seguidamente, se incorporaron 50  $\mu$ l de la suspensión de látex al 1% para estudiar la reducción del NBT en presencia de estímulo fagocítico (muestras estimuladas), y 50  $\mu$ l de Hank para el estudio de los niveles basales de anión superóxido (muestras basales o no estimuladas). Transcurridos 60 min de incubación en baño con agitación suave a 37°C, la reacción se detuvo añadiendo 2,5 ml de ácido clorhídrico al 0,5 N a cada tubo. A continuación, se centrifugaron a 4°C durante 30 min a 1600 g. Tras desechar el sobrenadante, se extrajo el formazán formado (NBT reducido) intracelularmente, utilizando 1 ml de dioxano para romper las células. Los tubos se agitaron vigorosamente y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones anteriores. Las absorbancias de los

sobrenadantes se determinaron a 525 nm en espectrofotómetro empleando cubetas de vidrio óptico de 10 mm de paso óptico, con lo que se obtiene la medida de los niveles de superóxido intracelular (parámetro indicativo de la capacidad digestiva del material fagocitado). Los resultados se expresaron como nmol/ $10^6$  células, tras extrapolar las absorbancias en una curva patrón, obtenida utilizando ditioeritrol como agente reductor del NBT.

### ***Capacidad proliferativa de los linfocitos***

La actividad más característica de los linfocitos es su capacidad de respuesta proliferativa a antígenos o mitógenos. Para estudiarla se empleó el test de transformación linfoblástica (TTL) en respuesta a mitógenos, siguiendo una metodología ya estandarizada (De la Fuente *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008). Este ensayo analiza *in vitro* la respuesta proliferativa frente a mitógenos que reproduce la que tiene lugar *in vivo* frente a antígenos. Su fundamento reside en la capacidad de los linfocitos maduros de transformarse, en condiciones adecuadas, en células con capacidad de división o linfoblastos. Éstos sintetizan ADN, por lo que añadiendo un precursor de la síntesis que esté marcado, como timidina marcada con tritio ( $^3\text{H}$ -timidina), puede cuantificarse el crecimiento.

Para el estudio de la respuesta proliferativa en linfocitos de sangre periférica, se sembraron  $10^6$  linfocitos/ml de medio completo en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$ , en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano. En los pocillos destinados a determinar la respuesta proliferativa de los linfocitos frente a mitógeno, se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de fitohemaglutinina (PHA) (De la Fuente *et al.*, 2008), a una concentración de 125  $\mu\text{g/ml}$ , obteniéndose una concentración final, en el pocillo, de 12,5  $\mu\text{g/ml}$ . Previamente, se comprobó que dichas concentraciones se corresponden con las que producen una estimulación de la respuesta proliferativa óptima. En los pocillos para la valoración de la proliferación basal o espontánea, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de medio completo. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$  en una atmosfera saturada de humedad. En todo momento se trabajó en condiciones de esterilidad. Transcurrido este tiempo, se recogieron 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de cada pocillo para la valoración posterior de citoquinas. Seguidamente, se añadieron en cada pocillo 5  $\mu\text{l}$  de  $^3\text{H}$ -Timidina (0,5  $\mu\text{Ci/pocillo}$ ) y se renovó el medio completo adicionando 100  $\mu\text{l}$  de medio fresco. La incubación se prolongó durante 24 h más, tras las que se recolectaron las células



de cada pocillo en filtros, con un recolector de células semiautomático, lavando los pocillos tres veces con agua ultrapura. Los filtros se dejaron secar y se colocaron en viales a los que se añadieron 5 ml de líquido de centelleo. La timidina incorporada por los linfocitos se midió en un contador  $\beta$  de centelleo líquido, del que se obtuvieron las cuentas por minuto (cpm) de cada filtro. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. En la expresión de los resultados, se tuvo en cuenta la media aritmética de cpm en cada triplicado.

Además, se calculó la capacidad de estimulación proliferativa que relaciona la proliferación basal, a la que se le da el valor 100, y la estimulada con PHA, expresando el resultado como porcentaje.

### ***Actividad citotóxica Natural Killer (NK)***

Como se ha comentado previamente, las células NK, los linfocitos T CD8+, las células NKT, y también los macrófagos, pueden realizar funciones citotóxicas. En la presente tesis se valoró la capacidad citotóxica, concretamente la llamada citotoxicidad natural o NK, de leucocitos mononucleares procedentes de sangre periférica. Esta actividad les permite destruir *in vitro* de forma espontánea (sin sensibilización previa, ni presencia de anticuerpos), células tumorales. Para analizar esta capacidad lítica se utilizan como células dianas líneas tumorales procedentes de la misma especie de la que se obtienen los leucocitos que se quieren estudiar. En la presente tesis, se utilizaron como células dianas las de la línea K562, procedentes de un linfoma humano, las cuales fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se hicieron crecer en cultivo antes de su utilización. Dicho cultivo se realizó en frascos estériles mantenidos a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$ , con atmosfera saturada de humedad. El medio de cultivo consistió en RPMI enriquecido con un 10 % de suero fetal bovino descomplementarizado y suplementado con 1 % de gentamicina (0,1 mg/ml), que fue renovado cada dos días. Para ello, las células se lavaban a 300 g durante 10 min, desechándose el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento para el recuento y comprobación de la viabilidad celular mediante el test de exclusión de colorante vital azul tripán. La evolución del cultivo se controlaba periódicamente mediante observación al microscopio invertido, comprobando su crecimiento y la ausencia de posibles contaminaciones microbiológicas.

Para determinar la actividad NK se utilizó un kit colorimétrico comercializado (PROMEGA) que se basa en la detección y valoración de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), liberada al sobrenadante por las células lisadas, es decir, por la citólisis de las células diana. Para la realización del ensayo se siguió una metodología previamente descrita (De la Fuente *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008). Las células diana, previamente cultivadas, se lavaron durante 10 min a 400 g. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de RPMI sin rojo fenol, evitando así interferencias en la posterior detección colorimétrica, y se comprobó su viabilidad mediante el test de exclusión del azul tripán. Las células diana se ajustaron a  $10^5$  células vivas K562/ml RPMI sin rojo fenol. Las células efectoras, leucocitos mononucleares de sangre periférica, se ajustaron a  $10^6$  células/ml, para obtener una relación efectoras:diana de 10:1. Una vez ajustadas las suspensiones, se dispensaron 100  $\mu$ l en placas de 96 pocillos con fondo en forma de U, a los que se añadieron 100  $\mu$ l de la suspensión de células diana. Además se incluyeron pocillos en los que únicamente se adicionaron células diana, para cuantificar la lisis espontánea y total de las mismas, o sólo células efectoras, para la determinación de su lisis espontánea. Estos pocillos se completaron con 100  $\mu$ l de RPMI sin rojo fenol. Las placas se centrifugaron a 250 g durante 5 min, con objeto de favorecer los contactos celulares, y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, con atmósfera saturada de humedad, durante 4 horas. Transcurridas 3 h y 15 min de incubación, se añadieron 20  $\mu$ l de solución de lisis (Tritón X-100) proporcionado por el kit comercial, en los pocillos destinados a cuantificar la lisis total de las células diana. Tras las 4 h de incubación indicadas, las placas se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones anteriores y se recogieron 50  $\mu$ l de los sobrenadantes, los cuales se pasaron a una placa de 96 pocillos con fondo plano, que permite la posterior medida en el lector de placas. A cada pocillo se añadieron 50  $\mu$ l de una mezcla de sustratos de la enzima LDH (lactato, diaforasa y NAD<sup>+</sup>), incubándose la placa 30 min más a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia a 490 nm, lo cual nos proporcionó la actividad de la LDH en los sobrenadantes. El porcentaje de lisis se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ lisis: } [( \text{lisis problema} - \text{lisis espontánea}_{\text{efectoras}} - \text{lisis espontánea}_{\text{diana}} ) / ( \text{lisis total} - \text{lisis espontánea}_{\text{diana}} )] \times 100$$

siendo: la lisis problema, la medida de las absorbancias obtenidas en los pocillos donde se incubaron células efectoras junto con células diana; la lisis espontánea, la media de las

absorbancias obtenidas en los pocillos sembrados sólo con células diana o con células efectoras; y la lisis total, la media de las absorbancias obtenidas en los pocillos conteniendo células diana, a los que se añadieron 20 µl de solución de lisis o Tritón X-100.

En cada experimento los ensayos se realizaron por triplicado, utilizándose en la ecuación la media de las absorbancias obtenidas para cada tipo de lisis.

### **3.3.1.3. Estudio de los niveles de citoquinas y sus receptores solubles**

Las citoquinas y sus receptores son importantes moduladores de la compleja red de interacciones celulares que regula la respuesta inmunitaria. Para su valoración, se emplearon distintas muestras biológicas como son 1) el sobrenadante de cultivo de células mononucleares en respuesta a PHA, 2) el plasma de sangre total con una incubación previa en ausencia/presencia de LPS, y 3) el plasma.

#### ***En sobrenadantes de cultivo***

Todos los sobrenadantes, recogidos en los pocillos de las placas de cultivo de los leucocitos mononucleares tras 48 h de incubación en presencia de PHA (véase “Capacidad proliferativa de los linfocitos” del apartado 3.3.1.2.), fueron mantenidos a -20 °C hasta el momento de su utilización. A la hora de realizar el ensayo, las alícuotas se descongelaron en frío y se centrifugaron 10 min a 1000 g, para eliminar posibles restos celulares y agregados.

El método de valoración para la detección de citoquinas fue mediante luminometría. Se empleó el kit “Milliplex® Map” de alta sensibilidad para citoquinas humanas (MILLIPORE), que permite la detección simultánea (MULTIPLEX) en una misma muestra de varias citoquinas. En la presente tesis se valoraron IL-2, IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-8 e IL-10.

Inicialmente, las muestras no fueron diluidas, lo que dio lugar a que la citoquina IL-10 excediera, en términos de concentración, a la curva patrón proporcionada por el kit (resultados correspondientes al 1º objetivo de la presente tesis). Por lo tanto, en el segundo kit empleado para la valoración de dichas citoquinas, se utilizaron sobrenadantes con una dilución 1:4 (resultados correspondientes al 3º objetivo).

Para su determinación, primeramente, se añadieron a una placa de 96 pocillos, 25 µl de una solución, previamente sonicada en baño, de anticuerpos monoclonales frente a las citoquinas mencionadas, cada uno de ellos unido a diferentes tipos de microesferas. Cada tipo de microesfera se define por unas precisas concentraciones de dos fluoróforos, dando lugar a 100 posibles microesferas distintas, cada una de las cuales está recubierta con un tipo anticuerpo específico. Seguidamente, se aplicó vacío para eliminar el líquido de la placa, quedándose así todas las microesferas retenidas en la membrana del fondo de los pocillos. A continuación, se adicionaron alícuotas de 50 µl de los sobrenadantes de cultivo de 48 h de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA, así como mismos volúmenes de los estándares y controles positivos de concentraciones conocidas. Tras una incubación de 16-18 h a 4 °C con agitación, se aplicó vacío, se lavó, y se añadieron 75 µl de una solución de anticuerpos, conjugados con biotina, frente a las citoquinas especificadas con anterioridad. Tras una incubación de 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad, se añadieron 50 µl de una solución del conjugado estreptavidina-ficoeritrina a cada pocillo, para completar la reacción en la superficie de cada microesfera. La placa se incubó 30 min en las mismas condiciones anteriores, y seguidamente se aplicó vacío. Por último, tras su lavado, se añadió el fluido apropiado para pasar las muestras por el luminómetro (Luminex 200™). Los resultados se expresaron como pg/ml con ayuda del software de análisis de datos Luminex 100 Integrated System 2.3.

Este kit tiene mayor sensibilidad y rango de linealidad que los ELISAs convencionales. Las características del kit se especifican en la tabla I.

**Tabla I.** Características generales del MULTIPLEX empleado para la valoración de citoquinas en los sobrenadantes de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA.

<b>Citoquina</b>	Mínimo detección (pg/ml)	Precisión intra- ensayo (%)	Precisión inter- ensayo (%)	% Recuperación
<b>IL-1β</b>	0,06	3,11	2,16	102,9
<b>IL-2</b>	0,16	4,27	7,48	98,8
<b>IL-6</b>	0,10	3,51	4,48	100,7
<b>IL-8</b>	0,11	3,26	6,48	103,1
<b>IL-10</b>	0,15	3,31	11,84	93,1
<b>TNF-α</b>	0,05	3,49	3,78	103,6

### ***En plasma de sangre completa incubada en ausencia/presencia de LPS***

El estudio de los niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 en el plasma de sangre total incubada previamente en ausencia/presencia de LPS (véase el punto 3 “Obtención de plasma procedente de sangre estimulada previamente o no con LPS” del apartado 3.3.1.1.), así como los niveles de algunos de sus receptores solubles sIL-6R, sTNF-RI y sTNF-RII valorados en el plasma procedente de sangre estimulada con LPS, se llevó a cabo a través de dos métodos que a continuación se detallan.

Todas las muestras fueron mantenidas a -20°C hasta su utilización, descongeladas en frío y centrifugadas 10 min a 1000 g antes de su valoración, para eliminar posibles restos celulares y agregados.

#### **1) ELISA de fase sólida**

Este método fue utilizado para la valoración de los niveles de IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , sIL-6R, sTNF-RI y -RII presentados en los apartados 4.1.3.2. y 4.1.3.3., así como en el 4.5.3., de los resultados correspondientes a los objetivos 1 y 5, respectivamente.

Las muestras, los estándares y los controles de concentración conocida, de cada citoquina y receptor soluble, se incorporaron a una placa de ensayo adsorbida con un anticuerpo específico frente a dichas citoquinas y receptores solubles. El principio fue similar para la valoración de todos ellos, con variaciones que se detallan a continuación. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente, y la medida de las absorbancias se realizó a 450 nm.

- ***Niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  en el plasma de sangre incubada previamente en ausencia/presencia de LPS:*** Las concentraciones de IL-6 y TNF- $\alpha$  se determinaron mediante los kits ELISA comerciales “QUANTIKINE® Human IL-6” y “QUANTIKINE® Human TNF- $\alpha$ /TNFSF1A”, respectivamente (R&D SYSTEMS). Todos los plasmas procedentes de la sangre incubada con LPS fueron diluidos 1:9 para la valoración de IL-6, y 1:3 para la de TNF- $\alpha$ . Tras la incubación de las muestras, los estándares y los controles con sus respectivos anticuerpos monoclonales adsorbidos al fondo del pocillo, se

procedió a su lavado y se añadió el anticuerpo policlonal frente a IL-6 o TNF- $\alpha$ , respectivamente, conjugado con peroxidasa (HRP), para su posterior incubación. A continuación, los pocillos se lavaron y se incubaron con el sustrato, compuesto por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y tetrametilbenzidina (TMB). Seguidamente, se incorporó la solución stop (ácido sulfúrico al 2N), se valoraron las absorbancias de los pocillos de cada placa, y se corrigieron con la medida a una longitud de onda de 540 o 570 nm. Los resultados se expresaron en pg/ml. Las características del kit se especifican en la tabla II.

- *Niveles de **IL-8** en el plasma de sangre incubada previamente en presencia de LPS:* La concentración de IL-8 se determinó mediante el kit ELISA comercial “QUANTIKINE® Human CXCL8/IL-8” (R&D SYSTEMS). Se realizó una dilución 1:2 en todas las muestras. El protocolo experimental fue idéntico al descrito para las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$ . Las características del kit se especifican en la tabla II.

- *Niveles de **IL-10** en el plasma de sangre incubada previamente en ausencia/presencia de LPS:* La valoración de los niveles de IL-10 se determinaron mediante el kit comercial “Human High sensitivity IL-10 ELISA Kit” (DIACLONE). Los pocillos con las muestras, los estándares y los controles se incubaron con un anticuerpo frente a IL-10 biotinilado. Seguidamente, se lavaron y se realizaron dos ciclos de adición de una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa, con lavados y una incorporación de un amplificador entre medias. Finalmente, se añadió un sustrato basado en una solución de TMB, una solución stop (ácido sulfúrico) y se procedió a la lectura de la placa. Los resultados se expresaron en pg/ml. Las características del kit se especifican en la tabla II.

- *Niveles de **sIL-6R** en el plasma de sangre estimulada previamente con LPS:* La medición de la concentración de sIL-6R se realizó mediante el kit ELISA comercial “QUANTIKINE® Human IL-6 sR” (R&D SYSTEMS). Se realizó una dilución 1:100 para todas las muestras. El protocolo de procedimiento fue similar al empleado para valorar los niveles de IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ . Los resultados se expresaron en ng/ml. Las características del kit se especifican en la tabla II.

- *Niveles de **sTNF-RI y -RII** en el plasma de sangre estimulada previamente con LPS:* La determinación de los receptores I y II de TNF se realizó mediante el kit ELISA “Human soluble TNF-Receptor I (p55/p60) and II (p75/p80)”. Previamente, todas las muestras

fueron diluidas 1:10. Las muestras, los estándares y los controles se incubaron en sus correspondientes pocillos adsorbidos con sus respectivos anticuerpos monoclonales. Tras los lavados, se añadieron los anticuerpos policlonales frente a sTNF-RI y –RII conjugados con biotina. Tras la incubación y los posteriores lavados, se adicionó un conjugado de estreptavidina y peroxidasa que se dejó incubando. A continuación, los pocillos se lavaron y se incubaron con el sustrato, compuesto por TMB. Seguidamente, se incorporó la solución stop (ácido cítrico al 2M), y se procedió a la lectura de la placa. Los resultados se expresaron en pg/ml. Las características del kit se especifican en la tabla II.

**Tabla II.** Características generales de los ELISAs empleados para la valoración de citoquinas y alguno de sus receptores en el plasma de sangre total incubada previamente en ausencia/presencia de LPS.

ELISA	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- $\alpha$	sIL-6R	sTNF-RI	sTNF-RII
<i>Mínimo detección (pg/ml)</i>	<0,70	<7,5	<1,30	<1,6	<6,5	-	-
<i>Rango (pg/ml)</i>	3,12-300	31,2-2000	1,56-50	15,6-1000	31,2-2000	15,6-1000	15,6-1000
<i>Precisión intra-ensayo (%)</i>	1,6-4,2	5,4-6,5	7,8	4,2-5,2	2,3-8,6	-	-
<i>Precisión inter-ensayo (%)</i>	3,3-6,4	6,1-9,7	10,2	4,6-7,4	4,2-6,4	-	-

## 2) Luminometría

Este método se empleó para la valoración de los niveles de IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 en el plasma procedente de una incubación previa en ausencia/presencia de LPS (presentados en el apartado 4.3.3.2. de los resultados correspondientes al 3º objetivo).

El protocolo utilizado fue idéntico al empleado para la valoración de las citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de células mononucleares, anteriormente comentado. Se realizó una dilución previa 1:4 a todos los plasmas de sangre periférica estimuladas con LPS.

### ***En plasma***

Los niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10, así como los niveles de algunos de sus receptores solubles, sIL-6R, sTNF-RI y sTNF-RII, valorados en el plasma de

sangre periférica (véase el punto 2 “*Obtención del plasma*” del apartado 3.3.1.1.), se llevó a cabo a través de dos métodos que a continuación se detallan.

Todas las muestras fueron mantenidas a -20 °C, descongeladas en frío y centrifugadas 10 min a 1000 g antes de su valoración, para eliminar posibles restos celulares y agregados.

#### 1) ELISA de fase sólida

Este método fue utilizado para la valoración de los niveles plasmáticos de IL-6, IL-10, sIL-6R, sTNF-RI y –RII presentados en los apartados 4.1.4.1. y 4.1.4.2. de los resultados, correspondientes al objetivo 1.

Los kits comerciales y los protocolos empleados fueron los mismos que los detallados anteriormente en la valoración de citoquinas y algunos de sus receptores en el plasma de sangre incubada en ausencia/presencia de LPS. Para la valoración de sIL-6R, y sTNF-RI y –RII las muestras fueron diluidas 1:100 y 1:10, respectivamente.

#### 2) Luminometría

Este método se empleó para la valoración de los niveles plasmáticos de IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10, presentados en el apartado 4.3.3.3. de los resultados correspondientes al objetivo 3.

El kit comercial y el protocolo utilizado se han descrito anteriormente para la valoración de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de 48 h.

### **3.3.1.4. Estudio de compuestos pro- y anti-inflamatorios plasmáticos**

La valoración de los compuestos pro-inflamatorios IL-6 y sIL-6R, así como de los compuestos anti-inflamatorios IL-10, sTNF-RI y –RII, fueron realizados mediante ELISAs de fase sólida, descritos ya en el anterior apartado.



### ***Proteína C reactiva (PCR)***

Esta proteína de fase aguda y de síntesis hepática es un indicador ampliamente utilizado para la valoración del estado pro-inflamatorio sistémico. Su determinación se realizó mediante nefelometría, la cual se basa en la detección de partículas (antígeno-anticuerpo) suspendidas en líquido gracias a la dispersión que éstas producen en la luz procedente de una fuente luminosa y que es recogida por un dispositivo detector. Así, a mayor número de partículas, mayor es la dispersión captada. Para la valoración de las muestras, los estándares y los controles, se utilizó un kit comercial para la valoración de la PCR (SIEMENS) y el nefelómetro automático BN ProSpec® (SIEMENS) capaz de realizar análisis cuantitativos de proteínas del suero. Todos los plasmas fueron previamente ultrafiltrados mediante camisas de filtración para la eliminación de proteínas de gran tamaño. Los resultados se expresaron en µg/ml.

### **3.3.1.5. Estudio de compuestos oxidantes y defensas antioxidantes**

#### **Marcadores de oxidación**

##### ***Contenido intracelular de GSSG***

El glutatión es el antioxidante más potente presente en el organismo, gracias a la acción reductora del grupo tiol de su cisteína. La valoración del glutatión, tanto en su estado reducido (GSH) como en el oxidado (GSSG), es considerada un estimador muy fiable del grado de estrés oxidativo (Viña, 1990). A continuación se presenta la metodología empleada para la valoración de GSSG, mientras que la empleada para determinar el GSH se expone en el apartado correspondiente a las defensas antioxidantes, descrito más adelante.

La valoración de los niveles de GSSG se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Hissin y Hilf (1976), adaptado para placa de 96 pocillos, empleando como sonda fluorescente, el O-ftalaldehído (OPT). Este método se basa en la capacidad que posee el glutatión oxidado de reaccionar de forma óptima con el OPT a un pH de 12, dando lugar a la formación de un compuesto fluorescente.

#### Preparación de las muestras:

Se emplearon pellets de  $10^6$  de células, tanto de neutrófilos como de linfocitos, que se resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón fosfato con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,1 M (pH 8). Las muestras se sonicaron en frío mediante 3 ciclos de 10 s al 70 % de la potencia máxima (70 W), y dejando 20 s de reposo entre ellos. A continuación, se añadieron 400  $\mu$ l del mismo tampón fosfato, 5  $\mu$ l de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) al 60 % y se procedió a la centrifugación de las muestras a 9500 g durante 10 min a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se mantuvieron en frío hasta el momento de su utilización para la medición del glutatión oxidado.

#### Determinación de GSSG:

En una placa negra de 96 pocillos se adicionaron a cada pocillo, por duplicado, 10  $\mu$ l de muestra o patrón de la curva y 4  $\mu$ l de N-etilmaleimida (NEM) 0,04 M, que reacciona con el GSH presente en la muestra formando un complejo estable, y bloquea su posible autooxidación que ocurre a pH mayores de 8, evitando la consecuente sobrevaloración de los niveles de GSSG. Cabe destacar, que por la misma razón, la curva patrón del glutatión oxidado se realiza con hidróxido sódico (NaOH) 0,1 N. Seguidamente, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad. Pasado este tiempo, se añadieron 186  $\mu$ l de NaOH 0,1 N, para basificar el medio y 20  $\mu$ l de la sonda fluorescente, OPT 1 mg/ml en metanol, preparado inmediatamente antes de su utilización, en oscuridad para que reaccione con el GSSG presente en la mezcla de cada pocillo. Tras una incubación de la placa a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min, se midió la fluorescencia emitida por cada pocillo a una excitación de 350 nm y emisión de 420 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu$ g/mg de proteína, ya que se calculó la cantidad de proteínas presentes en los pellets de  $10^6$  de neutrófilos y linfocitos mediante el método del ácido bicinonínico (BCA), que se detalla a continuación.

#### Determinación de proteínas:

La valoración de las proteínas totales presentes en los pellets de  $10^6$  de células, tanto neutrófilos como linfocitos, se llevó a cabo mediante el método del ácido bicinonínico

(BCA), mediante el kit BCA compuesto por un reactivo A (BCA en condiciones alcalinas) y un reactivo B (sulfato de cobre). Este método se basa en la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  por los enlaces peptídicos de las proteínas en condiciones alcalinas, generando iones  $\text{Cu}^+$  que se unen al BCA y forman un compuesto coloreado que absorbe luz a 562 nm.

En placas de 96 pocillos de fondo plano, se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes de neutrófilos así como de linfocitos obtenidos de la preparación de las muestras para la valoración de GSSG y GSH (ver "*Preparación de las muestras*" en el apartado referente a **Contenido de GSSG**), y 10  $\mu\text{l}$  de estándares de una curva patrón generada con BSA. Seguidamente, se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  del reactivo BCA preparado con los reactivos A y B, en una proporción 50:1, respectivamente. Tras una incubación a 37 °C durante 30 min, se procedió a la valoración de la absorbancia presente en cada pocillo a 562 nm. Los resultados se expresaron en mg de proteína en 0,01 ml, para relacionarlo directamente con la cantidad de GSSG y GSH presente en ese mismo volumen.

### ***Cociente GSSG/GSH***

El cociente GSSG/GSH se calculó mediante la división de los valores obtenidos en el contenido de GSSG con los de GSH para cada tipo celular, neutrófilos y linfocitos, de un mismo individuo.

### ***Actividad xantina oxidasa***

La enzima xantina oxidasa (XO) es clave en el catabolismo de las purinas. Esta enzima cataliza la oxidación de las bases de purina a ácido úrico en una reacción en que las ROS se encuentran entre los productos finales.

Antes de comenzar el protocolo para la valoración de la actividad de la enzima XO en el plasma de sangre periférica humana, las muestras fueron descongeladas en frío y centrifugadas a 1000 g durante 10 min con el fin descartar posibles restos celulares y agregados.

Los niveles de actividad XO en plasma se determinaron mediante un ensayo fluorométrico utilizando el kit comercial Amplex Red Xantina / Xantina oxidasa (Invitrogen).

Este kit se basa en la capacidad de la XO en catalizar la oxidación de la xantina, lo que da lugar a ácido úrico y anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). En esta reacción, el  $O_2^{\cdot-}$  genera peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) de forma espontánea, que en presencia de peroxidasa (HRP) reacciona con el Amplex Red reagent (reactivo facilitado en el kit), generando un compuesto oxidado fluorescente, la resorufina, cuya emisión máxima de fluorescencia puede medirse aproximadamente entre 571 y 585 nm.

El ensayo de las muestras se lleva a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano y negro (NUNC). Tras añadir a los pocillos, primeramente, 50  $\mu$ l de una serie de muestras estándares de XO, un control positivo, un control negativo y las muestras a estudiar, se incorporan 50  $\mu$ l de una mezcla de reactivos proporcionados por el kit, Amplex red reagent + 0,4 U/ml HRP + 200  $\mu$ M xantina, a los mismos. La placa se agita suavemente y se incuba un mínimo de 30 minutos a 37 °C en oscuridad, y se realiza la lectura de la fluorescencia (excitación 530nm y emisión 595 nm). Los resultados se expresaron en  $\mu$ U.I./ml.

## **Defensas antioxidantes**

### ***Contenido intracelular de GSH***

La valoración de la forma reducida de glutatión (GSH) se realizó mediante la misma técnica empleada en la medición del GSSG (Hissin y Hilf, 1976). Este método se basa en la capacidad del GSH para reaccionar con la sonda fluorescente OPT (O-ftalaldehído) a un pH óptimo de 8, dando lugar a la formación de un compuesto fluorescente que se mide mediante fluorímetro.

Los pellets de  $10^6$  de células, tanto neutrófilos como linfocitos, fueron procesados siguiendo la misma metodología usada para la valoración del GSSG (ver “*Preparación de las muestras*” en el apartado referente a **Contenido de GSSG**).

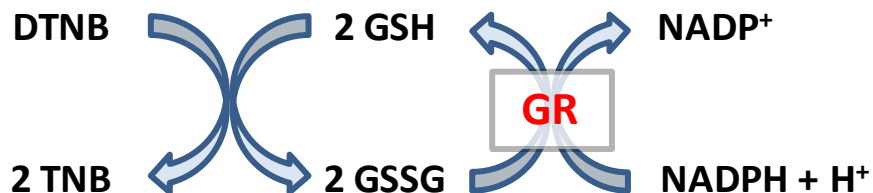
### **Determinación de GSH:**

En una placa negra de 96 pocillos se adicionaron a cada pocillo, por duplicado, 10  $\mu$ l de muestra o patrón de la curva, 190  $\mu$ l de tampón fosfato 0,1 M con EDTA (pH 8), y 20  $\mu$ l de la sonda fluorescente, OPT 1 mg/ml en metanol. Tras la incubación de esta mezcla a

temperatura ambiente durante 15 min en oscuridad, se procedió a la medición de la fluorescencia emitida por cada pocillo a una excitación de 350 nm, y emisión de 420 nm. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína, ya que se calculó la cantidad de proteínas presentes en los pellets de  $10^6$  de neutrófilos y linfocitos mediante el método del ácido bicinonínico (BCA), que se detalla en “Determinación de proteínas” del apartado referente a **Contenido de GSSG**).

### ***Niveles de glutatión total***

El glutatión total, formado mayoritariamente por su forma reducida (GSH), se determinó tanto en el interior de los leucocitos PMNs neutrófilos y mononucleares como en el plasma extraído de sangre periférica, siguiendo la técnica descrita por Tietze (1969). Ésta se fundamenta en el reciclado enzimático, donde el glutatión es secuencialmente oxidado por el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por el NADPH, en presencia de la enzima glutatión reductasa (GR):



Para la determinación del glutatión total se siguió el método descrito por Alvarado y colaboradores (2006a; 2006b) para células peritoneales. Los pellets de  $10^6$  de ambos tipos de células, neutrófilos y linfocitos, por separado, fueron resuspendidos en 100  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 5% con HCl 0,01 N, frío y previamente burbujeado en helio, que evita la autooxidación del GSH. Se sonicaron las células, también en frío, realizándose 3 ciclos de sonicación de 10 s cada uno al 70 % de la potencia máxima (70 W), y dejando 20 s de reposo entre ellos. A continuación, se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de solución de TCA, y la muestra se mantuvo en hielo. La solución de TCA se desoxigenó previamente burbujeándola con helio durante 10 min. A continuación, se procedió a la centrifugación de las muestras a 3200 g durante 5 min a 4 °C, y se procedió al análisis de los sobrenadantes. La absorbancia se midió en

espectrofotómetro a 412 nm, durante 4 min cada 20 s y con 60 s de retardo inicial, en presencia de DTNB 6 mM, NADPH 0,3 mM y GR 10 U/ml en tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM burbujeado; soluciones hechas en el momento del ensayo. También se realizaron medidas de la reacción sin muestra (sustituyendo ésta por solución de TCA) para evitar sobrevalorar el contenido de glutatión. Los valores obtenidos se restaron como factor de corrección. Así, se usaron microcubetas de vidrio óptico de 1 cm de paso de luz conteniendo:

1) Reacción con muestra:

500 µl NADPH + 70 µl DTNB + 70 µl muestra + 70 µl GR.

2) Reacción sin muestra:

500 µl NADPH + 70 µl DTNB + 70 µl solución de TCA + 70 µl GR.

3) Blanco:

500 µl NADPH + 70 µl DTNB + 70 µl muestra + 70 µl solución de TCA.

Se realizó la curva patrón, en las mismas condiciones indicadas para las muestras, a partir de una solución madre de GSH, a una concentración de 64 µg/ml en solución de TCA de la que se hicieron sucesivas diluciones en tampón fosfato con EDTA 6,3 mM. Los resultados fueron expresados como nmol/10<sup>6</sup> células, neutrófilos o bien linfocitos.

En el caso de las muestras plasmáticas, éstas fueron centrifugadas durante 10 min a 1000 g en frío con el fin de eliminar restos celulares y agregados, y sin necesidad de procesamiento posterior, fueron empleadas directamente en las reacciones arriba mencionadas. Se realizó otra curva patrón de la misma forma antes señalada, a partir de una solución madre de GSH de 8 µg/ml. Los resultados se expresaron en µM.

### ***Niveles de ácido úrico en plasma***

El ácido úrico es un compuesto de carácter antioxidante derivado del metabolismo de las purinas muy valorado en clínica. Su valoración fue determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las muestras plasmáticas fueron centrifugadas en frío (1000 g, 10 min, 4 °C) para la eliminación de posibles impurezas y se tomaron 10 µl de los sobrenadantes, así como de los estándares y controles, para su valoración en el cromatógrafo. Las condiciones de la medición fueron las siguientes: La fase móvil, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

0,03 M a un flujo de 0,7 ml/min y temperatura de 40°C, y columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm). El ácido úrico fue detectado a una longitud de onda de 210 nm. Tras el análisis de los valores mediante el gestor de datos Millenium 32 versión 3.20, los resultados fueron expresados en mg/dl.

### ***Capacidad antioxidante total***

La capacidad antioxidante total fue valorada en el plasma así como en las células sanguíneas resuspendidas en RPMI 1640 sin rojo fenol, mediante un Kit comercial (Deltaclon) basado en la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  por la acción de todos los compuestos antioxidantes presentes en la muestra. El  $\text{Fe}^{2+}$  se combina con el fenantreno para formar un compuesto coloreado cuya absorción puede ser medida a 520 nm mediante espectrofotometría. Los resultados fueron expresados en unidades internacionales de capacidad antioxidante total por mililitro (U.I./ml). Una unidad de capacidad antioxidante total se define como el incremento en el valor de absorbancia de la reacción de 0,01 por minuto en cada ml de plasma a 37 °C.

#### **3.3.1.6. Valoración del daño oxidativo. 8-isoprostano**

Los isoprostanos son una familia de eicosanoides no enzimáticos que tienen su origen en la oxidación seriada de los fosfolípidos tisulares por la acción de los radicales libres de oxígeno. La valoración de 8-isoprostano (8-iso prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ ) en plasma fue realizada mediante el kit EIA 8-isoprostano (CAYMAN) basado en un ensayo competitivo. El 8-isoprostano presente en la muestra compite con el 8-isoprostano conjugado con la enzima acetilcolinesterasa, proporcionado por el kit, por unirse a los anticuerpos monoclonales de IgG de ratón adsorbidos al fondo del pocillo. Dado que la concentración del conjugado de 8-isoprostano es siempre constante y la de la muestra varía, la cantidad de conjugado que será capaz de unirse será inversamente proporcional a la concentración de 8-isoprostano de la muestra en el pocillo. Se emplearon 50 µl de muestra (diluida 1:2), estándares y controles. Hay que puntualizar que la fracción valorada de 8-isoprostano fue la libre, que constituye menos de la mitad del 8-isoprostano total del plasma (el resto se encuentra unido a fosfolípidos, impidiendo así su medición), ya que no se realizó el protocolo de hidrólisis

alcalina necesario para su separación. Tras una incubación de 18 h y la adición del sustrato de la acetilcolinesterasa, el reactivo de Ellman, se procedió a la lectura de la placa, espectrofotométricamente, a una absorbancia de 412 nm. Los resultados se expresaron en pg/ml.

### **3.3.2. Métodos en ratones**

#### **3.3.2.1. Obtención de leucocitos peritoneales. Recuento y viabilidad celular**

El protocolo seguido para la extracción de la suspensión peritoneal, previamente descrito por Guayerbas y colaboradores (2002b), permite la obtención de leucocitos sin necesidad de sacrificar a los animales, lo que abre la posibilidad de realizar estudios longitudinales. La extracción fue realizada siempre a la misma hora y en la fase oscura de su ciclo vital (8.15-10.00 h), mediante el siguiente protocolo:

**1) Sujeción del animal:** Con los dedos pulgar e índice se sujetó al ratón por la piel de la parte posterior de la cabeza; se le dio la vuelta, colocándolo boca arriba y se inmovilizaron las extremidades inferiores sujetando la cola por su zona más anterior entre los dedos anular y meñique, y la palma de la mano.

**2) Inyección de un medio salino:** Una vez inmovilizado el ratón, se le inyectó intraperitonealmente un volumen de 3 ml de solución de Hank estéril, atemperada a 37 °C, y se masajeó suavemente el abdomen.

**3) Obtención de la suspensión peritoneal:** La suspensión peritoneal va saliendo por el mismo orificio por el que fue introducida la solución de Hank, recogién dose aproximadamente el 90% del volumen inyectado, el cual se depositó en un tubo de vidrio estéril que se mantuvo en todo momento en hielo.

**4) Recuento de las células de la suspensión peritoneal:** Las células obtenidas del peritoneo fueron principalmente linfocitos y macrófagos, en proporción aproximada del 69% y 29%, respectivamente. Los macrófagos y linfocitos fueron identificados por su morfología y tamaño característicos, y contabilizados por ml de suspensión utilizando un hemocitómetro de Neubauer y un microscopio óptico.



**5) Viabilidad celular:** La viabilidad de las células obtenidas y utilizadas en los distintos ensayos fue comprobada mediante el método de exclusión del colorante vital azul tripán, ya descrito previamente en el apartado 3.3.1.1. En todos los experimentos que se llevaron a cabo, solamente se utilizaron las suspensiones celulares con una viabilidad mayor del 98%.

### **3.3.2.2. Análisis de las subpoblaciones celulares presentes en las suspensiones peritoneales**

La determinación de las principales poblaciones leucocitarias presentes en las suspensiones peritoneales se realizó mediante el marcaje, con diversos anticuerpos monoclonales, de diversos antígenos de diferenciación leucocitaria (CD) de la superficie de la membrana de las células. Se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales (BD Biosciences), a las concentraciones finales que se indican:

CD45 conjugado con peridínclorofil (PerCP) ( $0,05 \mu\text{g}/10^6$  células)

CD11b conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) ( $1,25 \mu\text{g}/10^6$  células)

CD335 conjugado con ficoeritrina (PE) ( $0,2 \mu\text{g}/10^6$  células)

CD19 conjugado con FITC ( $1 \mu\text{g}/10^6$  células)

CD5 conjugado con PE ( $0,1 \mu\text{g}/10^6$  células)

CD25 conjugado con PerCP-cianina ( $0,2 \mu\text{g}/10^6$  células)

CD45RA conjugado con PE ( $0,2 \mu\text{g}/10^6$  células)

CD3 conjugado con aloficocianina (APC) ( $0,25 \mu\text{g}/10^6$  células)

CD4 conjugado con FITC ( $0,1 \mu\text{g}/10^6$ )

CD8 conjugado con FITC ( $1,25 \mu\text{g}/10^6$  células)

De este modo, tras obtener la suspensión peritoneal, ésta se centrifugó a 400 g durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 1 ml de medio PBS-BSA (1%). El BSA disminuye la unión inespecífica por parte de los anticuerpos. Tras el recuento celular, se procedió a preparar alícuotas de  $2 \times 10^5$  células, que son las que se emplearon para el marcaje, en base a la mínima cantidad de células que es necesario adquirir en el citómetro. Una vez preparadas, se centrifugaron a 580 g durante 10 min, tras

lo cual se eliminó el sobrenadante y se añadió un volumen de 30 µl con la mezcla de anticuerpos correspondiente. Asimismo, se prepararon tubos blancos y con marcajes simples para ajustar las condiciones del citómetro antes de empezar a adquirir las muestras. Las alícuotas con las mezclas de anticuerpos se incubaron durante 30-45 min en frío y en oscuridad y, pasado ese tiempo, se realizan dos lavados (añadiendo PBS-BSA y centrifugando a 580 g durante 5 min y a 4 °C) para retirar el exceso de anticuerpo no unido. Posteriormente, las células se resuspendieron en 100 µl del mismo tampón e inmediatamente se adquirieron en el citómetro de flujo (FACSCalibur Flow Cytometer, Becton Dickinson). Las células fueron seleccionadas en función de sus características de dispersión en relación al tamaño (*forward scatter*) y complejidad (*side scatter*) de las células. El análisis de datos se realizó con ayuda del software Cell Quest Pro (BD Biosciences), obteniendo como resultado el porcentaje de células CD11b+, CD335+, CD19+ (CD19+CD25+ y CD19+CD5+) y CD3+ con respecto al número de células CD45+ presentes en la muestra, y de CD4+ (CD4+CD25+ y CD4+CD45RA+) y CD8+ (CD8+CD25+ y CD8+CD45RA+) con respecto al número de células CD3+.

### **3.3.2.3. Estudio de las funciones de células inmunitarias**

Los macrófagos de la suspensión peritoneal se ajustaron a  $5 \times 10^5$  macrófagos/ml de medio Hank (De la Fuente, 1985; Puerto *et al.*, 2002).

Para la valoración de las funciones de linfocitos y la actividad citotóxica NK, se realizaron tres alícuotas; una de ellas se ajustó a  $10^6$  linfocitos/ml de medio completo para el ensayo de respuesta proliferativa. Las otras dos alícuotas se ajustaron en RPMI sin rojo fenol, para la valoración de la quimiotaxis y la actividad citotóxica Natural Killer (NK), a una concentración final de  $5 \times 10^5$  linfocitos /ml y  $10^6$  leucocitos/ml, respectivamente (De la Fuente *et al.*, 1998; Guayerbas *et al.*, 2002b). La cantidad de células que se obtienen de la suspensión peritoneal es muy limitada, y por ello, se optimizó al máximo la concentración de células que se emplea en cada ensayo.

Seguidamente se expone la metodología utilizada para el estudio de cada una de las funciones estudiadas en los macrófagos y linfocitos peritoneales. Cada ensayo,

correspondiente a un individuo y una toma de muestra, fue realizado por duplicado o triplicado.

### ***Capacidad de movilidad inducida o quimiotaxis de los leucocitos***

Se siguió una técnica similar a la previamente descrita para los leucocitos humanos (De la Fuente *et al.*, 1998), pero aplicada a las células inmunitarias peritoneales de ratones (De la Fuente *et al.*, 2002). Se emplearon alícuotas de  $5 \times 10^5$  macrófagos/ml o  $5 \times 10^5$  linfocitos/ml, en cada caso, en solución de Hank o RPMI sin rojo fenol, respectivamente. Tras la colocación de las muestras en las cámaras de Boyden, las incubaciones y los tratamientos de los filtros ya comentados, en el apartado 3.3.1.2., se contabilizó el número de macrófagos y de linfocitos peritoneales, según el caso, que aparecen en 4 barridos de 5 mm (con lo que se recorre aproximadamente 1/3 de la superficie total del filtro) mediante el microscopio con objetivo de inmersión (100x). El valor obtenido en dichos recuentos es el IQ.

### ***Capacidad de fagocitosis de macrófagos***

Para valorar la capacidad de ingesta de cuerpos extraños (bolas de látex) que tienen los macrófagos, se empleó la técnica descrita por De la Fuente (1985), detallada con anterioridad para los neutrófilos humanos. En este caso, se dispensaron en placas MIF alícuotas de 200  $\mu$ l de la suspensión ajustada a  $5 \times 10^5$  macrófagos/ml, en solución de Hank. Los resultados se expresaron como IF, esto es, número de partículas ingeridas por 100 fagocitos tomados al azar, y EF, porcentaje de células, en las 100 contabilizadas, que fagocitaron al menos una partícula.

### ***Capacidad proliferativa de los linfocitos***

Para el estudio de la respuesta proliferativa en linfocitos peritoneales de ratón, se sembraron  $10^6$  linfocitos/ml de medio completo (RPMI 1640 con 1% gentamicina, 0,1 mg/ml, y suplementado con 10% suero fetal de ternera descomplementarizado), en alícuotas de 200  $\mu$ l, en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano, siguiendo una metodología ya estandarizada (Del Río *et al.*, 1994; De la Fuente y Víctor, 2000), y muy similar a la

previamente descrita para las muestras procedentes de humano (De la Fuente *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008). En este caso, en los pocillos destinados a determinar la respuesta proliferativa de los linfocitos frente a mitógeno, se adicionaron 20 µl de concanavalina A (ConA) o de lipopolisacárido (LPS), a 1 µg/ml de cada mitógeno en sus correspondientes pocillos, concentración adecuada para una estimulación de la repuesta proliferativa óptima. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se calcularon como la media aritmética de cpm en cada triplicado.

### ***Actividad citotóxica Natural Killer (NK)***

Se valoró la capacidad citotóxica NK de los leucocitos peritoneales murinos, para lo que se empleó, como células diana, la de la línea celular YAC-1 procedente de un linfoma murino, que fue manipulada de forma similar a la ya mencionada para la línea K562 humana. Se siguió una técnica previamente descrita (De la Fuente *et al.*, 1998; Ferrández *et al.*, 1999), utilizando el kit colorimétrico comercializado (PROMEGA), y que ya ha sido descrita en el apartado 3.3.1.2. Los leucocitos se ajustaron a  $10^6$  células totales/ml en RPMI sin rojo fenol, obteniéndose en el pocillo una relación efectoras:diana de 10:1. Los resultados se expresaron como % lisis, realizando los experimentos por triplicado.

### **3.3.2.4. Estudio de compuestos oxidantes y defensas antioxidantes**

#### **Marcadores de oxidación**

##### ***Contenido GSSG en leucocitos***

La valoración de los niveles intracelulares de GSSG se realizó empleando pellets de  $10^6$  de leucocitos totales, de manera similar a la descrita previamente en el apartado 3.3.1.5. para los leucocitos humanos. Los resultados se expresaron en µg/mg de proteína, ya que se calculó la cantidad de proteínas presentes en los pellets de  $10^6$  de leucocitos mediante el método del ácido bicinonínico (BCA), detallado también anteriormente en el mismo apartado.

### ***Cociente intracelular de GSSG/GSH en leucocitos***

La división de los valores obtenidos en el contenido de GSSG con los de GSH de leucocitos peritoneales, dio lugar a la obtención del cociente GSSG/GSH.

### ***Actividad xantina oxidasa intracelular***

El análisis de la actividad de la enzima xantina oxidasa en las células inmunitarias peritoneales se llevó a cabo de manera similar a la empleada para el plasma humano anteriormente descrita (apartado 3.3.1.5.). En este caso, se emplearon alícuotas de 50 µl de la suspensión peritoneal ajustada a  $10^6$  leucocitos/ml de medio Hank, que fueron lisadas mediante congelación-descongelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los resultados se expresaron como mU.I./mg de proteína, ya que se calculó la cantidad de proteínas presentes en los pellets de  $10^6$  de leucocitos mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), detallado también anteriormente.

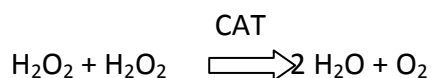
## **Defensas antioxidantes**

### ***Contenido de GSH en leucocitos***

La valoración de los niveles intracelulares de GSH se realizó empleando pellets de  $10^6$  de leucocitos totales, de manera similar a la descrita previamente en el apartado 3.3.1.5. para los leucocitos humanos. Los resultados se expresaron en µg/mg de proteína, ya que se calculó la cantidad de proteínas presentes en los pellets de  $10^6$  de leucocitos mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), que fue ya detallado con anterioridad.

### ***Actividad catalasa intracelular***

La determinación de la actividad de la enzima catalasa (CAT), la cual cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a agua, se llevó a cabo según la técnica descrita por Beers y Sizer (1952), con pequeñas modificaciones (Alvarado *et al.*, 2006a; 2006b). Este método se basa en el descenso de la absorbancia a 240 nm por unidad de tiempo, debido a la desaparición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la actividad de la enzima:



Las medidas se realizaron en microcubetas de cuarzo conteniendo:

- 670  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  14 mM, preparado en el momento en tampón fosfato 50 mM pH 7,0 burbujeado, y mantenido en hielo y oscuridad.
- 30  $\mu\text{l}$  de muestra, que fue sustituida por tampón fosfato para el blanco.

Se estudió la cinética de la reacción llevando a cabo la medida en espectrofotómetro a 240 nm y temperatura ambiente, desde su inicio cada 20 s y durante un total de 80 s, dado el corto intervalo de tiempo en que se produce la desactivación de la enzima. Los resultados se expresaron en U.I./ $10^6$  células y fueron calculados según la ecuación:

$$\text{U.I. CAT}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min}) \times F / \epsilon] \times (10^6/X)$$

siendo:

F: factor de dilución de la muestra en la cubeta ( $70/3=23,33$ ).

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm ( $43,6 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

X: número de células equivalente a los 30  $\mu\text{l}$  de muestra valorados ( $3 \times 10^5$ ).

### 3.3.2.5. Estudio de longevidad

Los animales fueron mantenidos hasta su muerte natural. Las fechas de muerte fueron anotadas con el fin de determinar la longevidad de los ratones.

## 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la presente tesis se utilizó el paquete estadístico SPSS 15.0. Los resultados se expresaron como media aritmética  $\pm$  error típico de los datos obtenidos en cada una de las diferentes pruebas.

El tratamiento estadístico consistió en determinar, en primer lugar, la distribución Normal de los datos mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov*.

Cuando los grupos experimentales se ajustaron a la Normalidad, se procedió a la prueba de la homogeneidad de las varianzas entre los grupos a través del test de *Levene*, para el posterior análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de *Tukey* para las comparaciones post hoc en el caso de varianzas homogéneas, o de *Games-Howell* en caso de que éstas no cumplieran la condición de homogeneidad. Los ANOVAs fueron de una o dos vías, dependiendo de las variables dependientes consideradas en cada diseño experimental. Así, por ejemplo, se realizaron ANOVAs de dos vías para el efecto de la edad (adulto, adulta-madura, madura) y el género (mujer, hombre), y el efecto de la edad (adulto, madura) y la estacionalidad (primavera, verano, otoño, invierno). Este análisis permitió determinar si existe alguna interacción entre los factores sobre alguno de los parámetros estudiados. Tras el análisis de dos vías, se realizó el ANOVA de una vía para poder comparar entre sí los distintos grupos experimentales de cada estudio.

Cuando los grupos experimentales no se ajustaron a una distribución Normal, se realizaron las pruebas no-paramétricas *Kruskal-Wallis* y *Mann-Whitney*.

En el “*Estudio de la relación entre la capacidad antioxidante total y diversos índices funcionales y estados patológicos en una población mayor de 65 años*”, además de realizar el ANOVA de una vía o el análisis no-paramétrico en función de la Normalidad de la muestra, en los casos en los que se enfrentaron dos variables continuas se determinaron los coeficientes de correlación (*r*) existentes mediante el test de *Pearson*.

En el “*Estudio de los cambios en la funcionalidad de las células inmunitarias en dos horas distintas del día*”, y en aquél que consiste en el “*Estudio de la funcionalidad de las células inmunitarias y las defensas antioxidantes en hombres con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)*”, el análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante la “*t*” de *Student* para muestras dependientes e independientes, e independientes, respectivamente.

En cuanto al “*Estudio longitudinal de las poblaciones, funcionalidad y estado de estrés oxidativo de células inmunitarias peritoneales de ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer*”, el análisis estadístico de los datos obtenidos de cada uno de los grupos experimentales de una misma edad, se realizó mediante la “*t*” de *Student* para muestras independientes, mientras que para el análisis de los resultados obtenidos de las distintas edades dentro de cada grupo experimental se empleó la “*t*” de *Student* para

muestras dependientes. El estudio de la longevidad, a través de la esperanza de vida media, se realizó mediante el test de *Kaplan-Meier*.

Se consideró que no existía significación en aquellos valores cuya probabilidad de significación asociada "*P*" era mayor de 0,05. Una diferencia de  $P \leq 0,05$  se consideró como significativa, de  $P \leq 0,01$  como muy significativa y de  $P \leq 0,001$  como altamente significativa.





# Resultados



#### 4.1. ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DEL SISTEMA INMUNITARIO. CAMBIOS CON LA EDAD EN LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EN PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y OXIDACIÓN

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en relación a diversos parámetros de funcionalidad del sistema inmunológico, y de inflamación y oxidación en una población dividida en tres grupos de edades: adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años), tanto hombres como mujeres.

##### 4.1.1. Cambios con la edad en las funciones de neutrófilos: Adherencia, movilidad espontánea, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares

Los resultados obtenidos en relación a las funciones estudiadas en neutrófilos se muestran en la tabla III y en la figura 8.

El factor edad ejerció una alta influencia ( $P \leq 0,001$ ) sobre los índices de **adherencia**, mostrando unos valores mayores ( $P \leq 0,001$ ) en maduros que en adultos y adultos-maduros. Dicho aumento se reflejó tanto en mujeres como en hombres maduros con respecto a adultos ( $P \leq 0,001$ ) y adultos-maduros ( $P \leq 0,01$  en mujeres y  $P \leq 0,001$  en hombres) (Fig. 8A). En cuanto al índice de **movilidad espontánea** de los neutrófilos, en el análisis realizado en la población total se apreció una alta influencia ( $P \leq 0,001$ ) de la edad, ya que en la edad madura tuvo lugar un aumento ( $P \leq 0,001$ ) de sus niveles en relación a la adulta, y una tendencia hacia niveles mayores en la madura en comparación con la adulta-madura ( $P = 0,054$ ). Al analizar mujeres y hombres por separado, dicho aumento sólo fue significativo ( $P \leq 0,05$ ) en las mujeres maduras con respecto a las adultas y a las adultas-maduras (Fig. 8B). Los factores género y edad ejercieron una influencia significativa ( $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,001$ , respectivamente) sobre los índices de **quimiotaxis**. Por un lado, los hombres ( $IQ = 496 \pm 10$ ) presentaron unos valores mayores que las mujeres ( $IQ = 464 \pm 11$ ), y por otro lado, en los adultos-maduros y los maduros se observó una disminución ( $P \leq 0,001$ ) de la quimiotaxis con respecto a los adultos. Además, los maduros mostraron unos niveles inferiores ( $P \leq 0,001$ ) que los adultos-maduros. En el análisis por grupos de sexo y edad se apreció una disminución ( $P \leq 0,001$ ) de los valores en adultos-maduros y en maduros con respecto a adultos, tanto en mujeres como en hombres, y niveles menores ( $P \leq 0,05$ ) en mujeres maduras en relación a adultas-maduras.

(Fig. 8C). Los índices de fagocitosis (Fig. 8D), tanto en mujeres como en hombres, disminuyeron en los individuos maduros en comparación con los adultos y los adultos-maduros ( $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,01$ , respectivamente), y en los adultos-maduros con respecto a los adultos ( $P \leq 0,001$ ). En la eficacia de fagocitosis se observó una alta influencia ( $P \leq 0,001$ ) del factor edad. Tanto los adultos-maduros como los maduros mostraron unos niveles inferiores ( $P \leq 0,001$ ) que los adultos, y los maduros aún menores ( $P \leq 0,05$ ) que los adultos-maduros. Sin embargo, al analizar ambos factores conjuntamente se apreció una disminución de la eficacia fagocítica sólo en maduros con respecto a adultos, en mujeres ( $P \leq 0,01$ ) y en hombres ( $P \leq 0,001$ ) (Fig. 8E). En cuanto a los niveles de anión superóxido en condiciones basales, en individuos adultos-maduros y en maduros tuvo lugar un aumento ( $P \leq 0,001$ ) de sus niveles en relación a los adultos, siendo el factor edad altamente influyente ( $P \leq 0,001$ ). En el caso de las mujeres, el análisis reveló unos valores mayores ( $P \leq 0,05$ ) sólo en maduras en comparación con adultas y una tendencia ( $P = 0,083$ ) hacia niveles mayores en adultas-maduras con respecto a adultas. En el caso de los hombres, los adultos-maduros y los maduros presentaron valores mayores ( $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,001$ , respectivamente) que los adultos (Fig. 8F). En los niveles de anión superóxido en condiciones estimuladas (Fig. 8G) se observaron los mismos resultados que en condiciones basales, pero el aumento de sus niveles en hombres maduros en relación a los adultos fue menor que en condiciones basales ( $P \leq 0,01$ ). El porcentaje de estimulación de anión superóxido intracelular, parámetro obtenido de la relación entre los niveles en condiciones basales, a la que se les da el valor 100, y estimuladas, apareció disminuido en los sujetos maduros en comparación con los adultos ( $P \leq 0,001$ ) y los adultos-maduros ( $P \leq 0,01$ ), mostrando una influencia ( $P \leq 0,01$ ) del factor edad sobre sus valores. El análisis por edad y género reveló que dicha disminución sólo era significativa en hombres ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 8H).

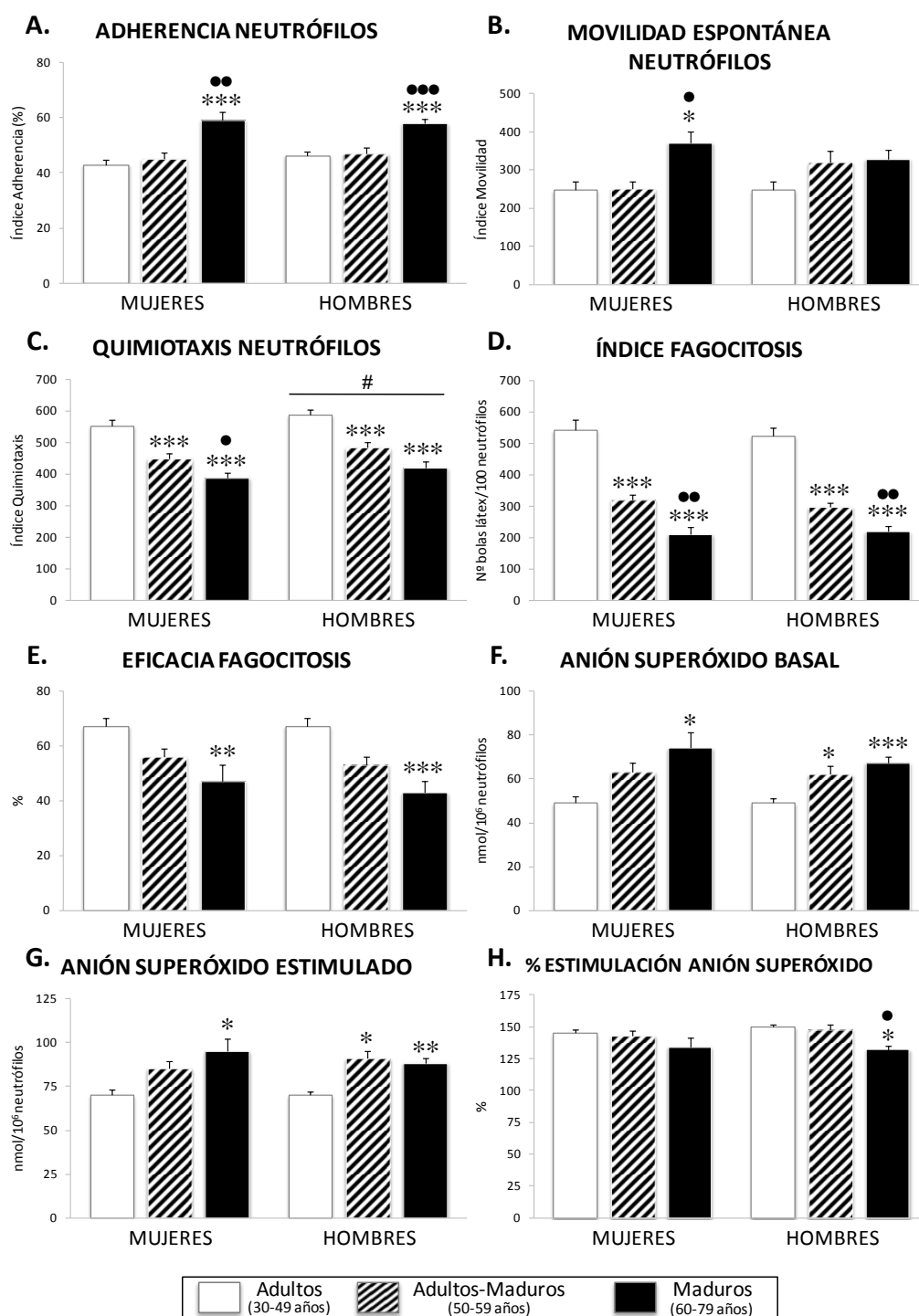
Al omitir el factor edad, no se encontraron diferencias significativas entre mujeres y hombres en los valores de las funciones arriba estudiadas, a excepción de los índices de quimiotaxis. Los índices de adherencia (IA), de movilidad espontánea (IM), el índice y la eficacia de fagocitosis (IF y EF), los niveles de anión superóxido intracelular en condiciones basales y estimuladas, y el porcentaje de estimulación en los niveles de anión superóxido, de neutrófilos de mujeres y hombres fueron: IA=49±1 y IA=50±1, respectivamente; IM=290±15 y IM=298±14, respectivamente; IF=358±13 y IF=347±12, respectivamente; EF=57±2 y

EF=55±2, respectivamente; 62±2 nmol/10<sup>6</sup> neutrófilos y 60±2 nmol/10<sup>6</sup> neutrófilos, y 83±3 nmol/10<sup>6</sup> neutrófilos y 83±3 nmol/10<sup>6</sup> neutrófilos, respectivamente; 141±3 % y 144±3 %, respectivamente.

**Tabla III.** Índice de adherencia (% neutrófilos adherentes), movilidad espontánea (número de neutrófilos en filtro), índice de quimiotaxis (número de neutrófilos en filtro), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 neutrófilos), eficacia de fagocitosis (número de neutrófilos que han fagocitado/100 neutrófilos) y niveles de anión superóxido intracelular (nmol/10<sup>6</sup> neutrófilos) en condiciones basales y estimuladas, y el porcentaje de estimulación (%) en los niveles de anión superóxido, de neutrófilos de sangre periférica de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años).

Función neutrófilos	30-49 años	50-59 años	60-79 años
<b>Índice de adherencia (%)</b>	(n=97)	(n=117)	(n=47)
<b>Población Total</b> (n=261)	<b>44±1</b>	<b>46±1</b>	<b>58±2</b>
<b>Mujeres</b> (n=126)	43±2	45±2	59±3
<b>Hombres</b> (n=135)	46±2	47±2	58±2
<b>Movilidad espontánea (nº neutrófilos)</b>	(n=49)	(n=57)	(n=53)
<b>Población Total</b> (n=159)	<b>248±19</b>	<b>285±17</b>	<b>350±18</b>
<b>Mujeres</b> (n=75)	249±20	250±20	371±29
<b>Hombres</b> (n=84)	247±23	320±28	328±25
<b>Índice de quimiotaxis (nº neutrófilos)</b>	(n=106)	(n=132)	(n=79)
<b>Población Total</b> (n=317)	<b>570±13</b>	<b>466±11</b>	<b>404±13</b>
<b>Mujeres</b> (n=147)	553±17	450±15	387±16
<b>Hombres</b> (n=170)	586±17	483±18	421±17
<b>Índice de fagocitosis (nº bolas látex)</b>	(n=49)	(n=59)	(n=38)
<b>Población Total</b> (n=146)	<b>532±15</b>	<b>309±14</b>	<b>216±18</b>
<b>Mujeres</b> (n=69)	542±33	320±17	211±21
<b>Hombres</b> (n=77)	523±25	297±13	220±16
<b>Eficacia de fagocitosis (%)</b>	(n=49)	(n=59)	(n=38)
<b>Población Total</b> (n=146)	<b>67±3</b>	<b>55±2</b>	<b>45±3</b>
<b>Mujeres</b> (n=69)	67±3	56±3	47±6
<b>Hombres</b> (n=77)	67±3	53±3	43±4
<b>Niveles de anión superóxido intracelular</b>	(n=95)	(n=102)	(n=79)
<b>- No estimulado (nmol/10<sup>6</sup> células)</b>			
<b>Población Total</b> (n=276)	<b>49±3</b>	<b>63±3</b>	<b>71±3</b>
<b>Mujeres</b> (n=122)	49±3	63±4	74±7
<b>Hombres</b> (n=154)	49±2	62±4	67±3
<b>- Estimulado (nmol/10<sup>6</sup> células)</b>			
<b>Población Total</b> (n=276)	<b>70±3</b>	<b>88±3</b>	<b>92±4</b>
<b>Mujeres</b> (n=122)	70±4	85±5	95±8
<b>Hombres</b> (n=154)	70±3	91±6	88±4
<b>- % Estimulación</b>			
<b>Población Total</b> (n=276)	<b>148±3</b>	<b>146±3</b>	<b>133±4</b>
<b>Mujeres</b> (n=122)	145±5	143±5	134±4
<b>Hombres</b> (n=154)	150±5	148±4	132±3

Los resultados son la media ± el error estándar de los valores correspondientes al número de sujetos (n) indicado en cada grupo experimental y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.



**Figura 8.** Índice de adherencia (% neutrófilos adherentes) (A), movilidad espontánea (número de neutrófilos en filtro) (B), índice de quimiotaxis (número de neutrófilos en filtro) (C), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 neutrófilos) (D), eficacia de fagocitosis (número de neutrófilos que han fagocitado/100 neutrófilos) (E) y niveles de anión superóxido intracelular (nmol/10<sup>6</sup> neutrófilos) en condiciones basales (F) y estimuladas (G), y el porcentaje de estimulación (%) en los niveles de anión superóxido (H), de neutrófilos de sangre periférica de adultos (n=49-106), adultos-maduros (n=57-132) y maduros (n=38-79), tanto mujeres (n=69-147) como hombres (n=77-170). Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar, siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos-maduros. # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.1.2. Cambios con la edad en las funciones de linfocitos: Adherencia, movilidad espontánea, quimiotaxis, proliferación y actividad NK

Los resultados obtenidos en relación a las funciones analizadas en linfocitos se muestran en la tabla IV y en la figura 9.

**Tabla IV.** Índice de adherencia (% linfocitos adherentes), movilidad espontánea (número de linfocitos en filtro), índice de quimiotaxis (número de linfocitos en filtro), proliferación (cuentas por minuto) basal y estimulada con fitohemaglutinina (PHA), la capacidad de estimulación proliferativa (%), y la actividad *Natural Killer* (% lisis de células tumorales) de linfocitos de sangre periférica de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años).

<b>Función linfocitos</b>	<b>30-49 años</b>	<b>50-59 años</b>	<b>60-79 años</b>
<b>Índice de adherencia (%)</b>	(n=109)	(n=119)	(n=56)
<b>Población Total</b> (n=284)	<b>44±1</b>	<b>48±1</b>	<b>54±2</b>
<b>Mujeres</b> (n=128)	42±2	47±2	53±3
<b>Hombres</b> (n=156)	46±2	48±2	55±2
<b>Movilidad espontánea (nº linfocitos)</b>	(n=60)	(n=62)	(n=61)
<b>Población Total</b> (n=183)	<b>249±20</b>	<b>276±19</b>	<b>354±19</b>
<b>Mujeres</b> (n=91)	216±17	249±20	350±35
<b>Hombres</b> (n=92)	281±23	302±23	358±35
<b>Índice de quimiotaxis (nº linfocitos)</b>	(n=122)	(n=132)	(n=79)
<b>Población Total</b> (n=333)	<b>310±7</b>	<b>280±7</b>	<b>258±8</b>
<b>Mujeres</b> (n=150)	322±11	273±11	246±10
<b>Hombres</b> (n=183)	299±9	287±10	271±8
<b>Proliferación</b>	(n=128)	(n=132)	(n=74)
<b>- Basal (cuentas por minuto)</b>			
<b>Población Total</b> (n=334)	<b>1503±106</b>	<b>1372±99</b>	<b>1456±147</b>
<b>Mujeres</b> (n=171)	1486±146	1248±140	1236±111
<b>Hombres</b> (n=163)	1520±156	1508±138	1701±281
<b>- En respuesta a PHA (cuentas por minuto)</b>			
<b>Población Total</b> (n=334)	<b>20063±1564</b>	<b>17353±1371</b>	<b>12767±1139</b>
<b>Mujeres</b> (n=171)	21993±2318	18477±2268	11948±1491
<b>Hombres</b> (n=163)	18193±2097	16121±1449	13680±1753
<b>- Capacidad de estimulación proliferativa (%)</b>			
<b>Población Total</b> (n=334)	<b>1745±152</b>	<b>1625±135</b>	<b>1118±102</b>
<b>Mujeres</b> (n=171)	1813±175	1883±213	1133±162
<b>Hombres</b> (n=163)	1680±247	1342±154	1102±121
<b>Actividad <i>Natural Killer</i> (% lisis)</b>	(n=72)	(n=82)	(n=72)
<b>Población Total</b> (n=226)	<b>46±2</b>	<b>37±2</b>	<b>23±2</b>
<b>Mujeres</b> (n=98)	47±3	39±2	23±2
<b>Hombres</b> (n=128)	46±3	35±2	24±2

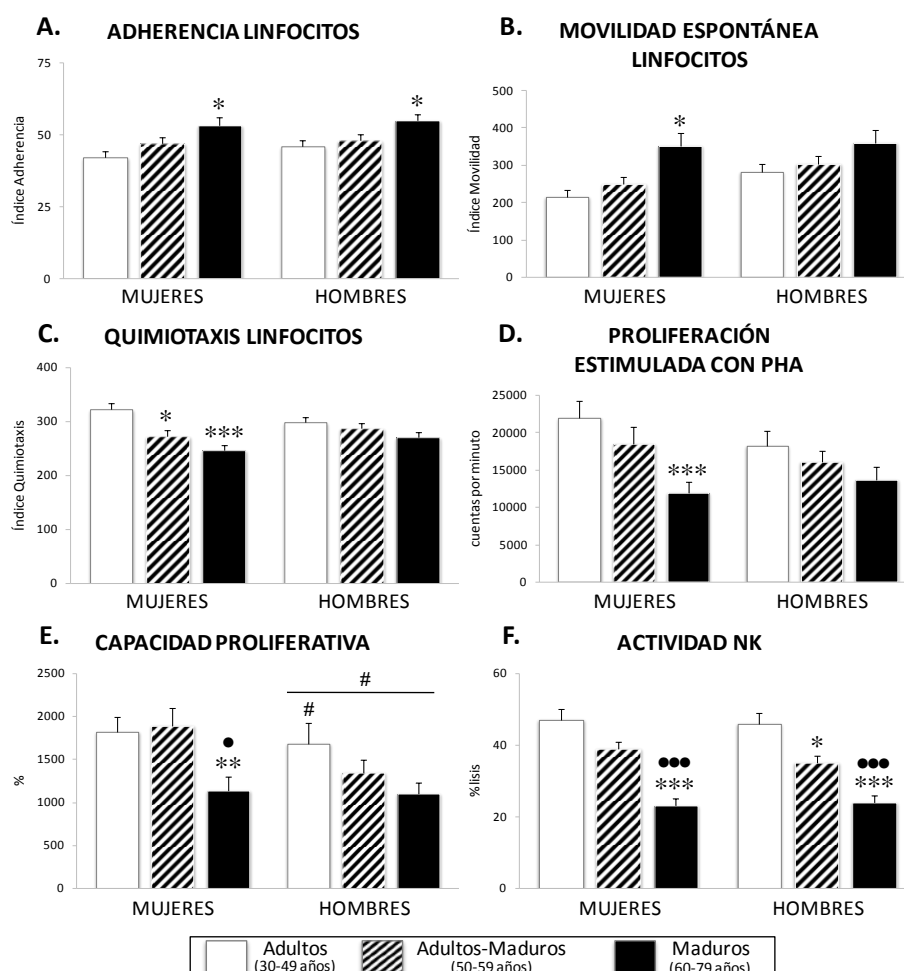
Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de los valores correspondientes al número de sujetos (n) indicado en cada grupo experimental y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado.



El factor edad ejerció una influencia altamente significativa ( $P \leq 0,001$ ) sobre los índices de **adherencia** en linfocitos. Sus niveles aumentaron en individuos maduros con respecto a adultos ( $P \leq 0,001$ ) y adultos-maduros ( $P \leq 0,01$ ). El análisis por grupos de género y edad reveló niveles mayores ( $P \leq 0,05$ ) en maduros en relación a adultos, tanto en mujeres como en hombres (Fig. 9A). De la misma forma, la edad ejerció un efecto altamente significativo ( $P \leq 0,001$ ) sobre los índices de **movilidad espontánea** de los linfocitos. La edad madura mostró unos valores superiores a la adulta ( $P \leq 0,001$ ) y adulta-madura ( $P \leq 0,05$ ), y el factor género ejerció una tendencia ( $P = 0,06$ ) hacia niveles mayores en hombres ( $ME = 314 \pm 16$ ) que en mujeres ( $ME = 272 \pm 16$ ). Al analizar mujeres y hombres por separado, se apreció un aumento ( $P \leq 0,05$ ) de la movilidad espontánea sólo en mujeres maduras en comparación con adultas (Fig. 9B). En la población total, los índices de **quimiotaxis** aparecieron disminuidos ( $P \leq 0,001$ ) con la edad. Tanto en los adultos-maduros como en maduros se observó una disminución ( $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,001$ , respectivamente) de sus niveles con respecto a los adultos. Dicha disminución sólo fue estadísticamente significativa en mujeres, las cuales presentaron valores menores en la edad adulta-madura ( $P \leq 0,05$ ) y madura ( $P \leq 0,001$ ) en relación a la adulta (Fig. 9C). En la proliferación en condiciones basales no se apreció diferencias significativas con la edad, y sí una tendencia ( $P = 0,088$ ) hacia niveles mayores en hombres ( $1555 \pm 101$  cpm) que en mujeres ( $1333 \pm 82$  cpm), efecto que aparece significativo ( $P \leq 0,05$ ) en la edad adulta-madura. Por otro lado, la proliferación en respuesta al mitógeno PHA disminuyó ( $P \leq 0,05$ ) con la edad. En los sujetos maduros tuvo lugar una disminución ( $P \leq 0,01$ ) de sus niveles en relación a los adultos y casi significativa ( $P = 0,078$ ) en relación a los adultos-maduros. Dicha disminución sólo fue significativa ( $P \leq 0,001$ ) en las mujeres maduras en comparación con las adultas (Fig. 9D). En la capacidad de estimulación proliferativa, parámetro que relaciona los niveles de proliferación en condiciones basales, a la que se les da el valor 100, y estimuladas con PHA, los hombres ( $1425 \pm 119$  %) mostraron unos niveles menores ( $P \leq 0,05$ ) que las mujeres ( $1686 \pm 115$  %), y especialmente en la edad adulta ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 9E). En los sujetos maduros sus valores fueron menores ( $P \leq 0,05$ ) con respecto a los adultos. El análisis de mujeres y hombres por separado reveló una disminución significativa en mujeres maduras con respecto a adultas ( $P \leq 0,01$ ) y adultas-maduras ( $P \leq 0,05$ ). El efecto de la edad sobre la **actividad citotóxica de las células NK** fue altamente significativo

( $P \leq 0,001$ ), ya que los tres grupos de edades mostraron diferencias altamente significativas ( $P \leq 0,001$ ) entre sí. Tanto en mujeres como en hombres, se observó una disminución ( $P \leq 0,001$ ) de la actividad en los individuos maduros en relación a los adultos y los adultos-maduros (Fig. 9F), y una disminución ( $P \leq 0,05$ ) en los adultos-maduros en comparación con los adultos sólo en los hombres.

Al omitir el factor edad, no se encontraron diferencias significativas entre mujeres y hombres en los valores de los índices de adherencia (IA), de quimiotaxis (IQ), la proliferación en respuesta a PHA y la actividad NK de linfocitos, cuyos valores fueron los siguientes: IA=47±1 y IA=50±1, respectivamente; IQ=280±6 y IQ=285±6, respectivamente; 18283±1323 cpm y 16423±1077 cpm, respectivamente; 36±1 % lisis y 35±1 % lisis, respectivamente.



**Figura 9.** Índice de adherencia (% linfocitos adherentes) (A), movilidad espontánea (número de linfocitos en filtro) (B), índice de quimiotaxis (número de linfocitos en filtro) (C), proliferación en respuesta a PHA (cuentas por minuto) (D), capacidad de estimulación proliferativa (%) (E) y actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis de células tumorales) (F) de linfocitos de sangre periférica de adultos (n=60-128), adultos-maduros (n=62-132) y maduros (n=56-79), tanto mujeres (n=91-171) como hombres (n=92-183). Cada columna representa la media ± el error estándar, siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ ,

\* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos-maduros. # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.1.3. Valoración de citoquinas y algunos de sus receptores solubles en diversas muestras biológicas

En este apartado se presentan los resultados en las valoraciones de diversas citoquinas y algunos de sus receptores en distintas muestras biológicas, como son 1) los sobrenadantes de cultivos de linfocitos en respuesta al mitógeno fitohemaglutinina (PHA), 2) el plasma procedente de sangre incubada previamente en ausencia/presencia de lipopolisacárido (LPS), nombrados *plasma (-)LPS* y *plasma (+)LPS*, respectivamente, y 3) el plasma (resultados mostrados en 4.1.4.1. y 4.1.4.2.), con el fin de comprobar posibles efectos distintos de la edad sobre sus niveles en cada tipo de muestra.

##### 4.1.3.1. Niveles de IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares estimuladas con PHA

Los resultados obtenidos en relación a los niveles de las citoquinas analizadas, IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10, en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos en respuesta a PHA, se muestran en la tabla V y en la figura 10.

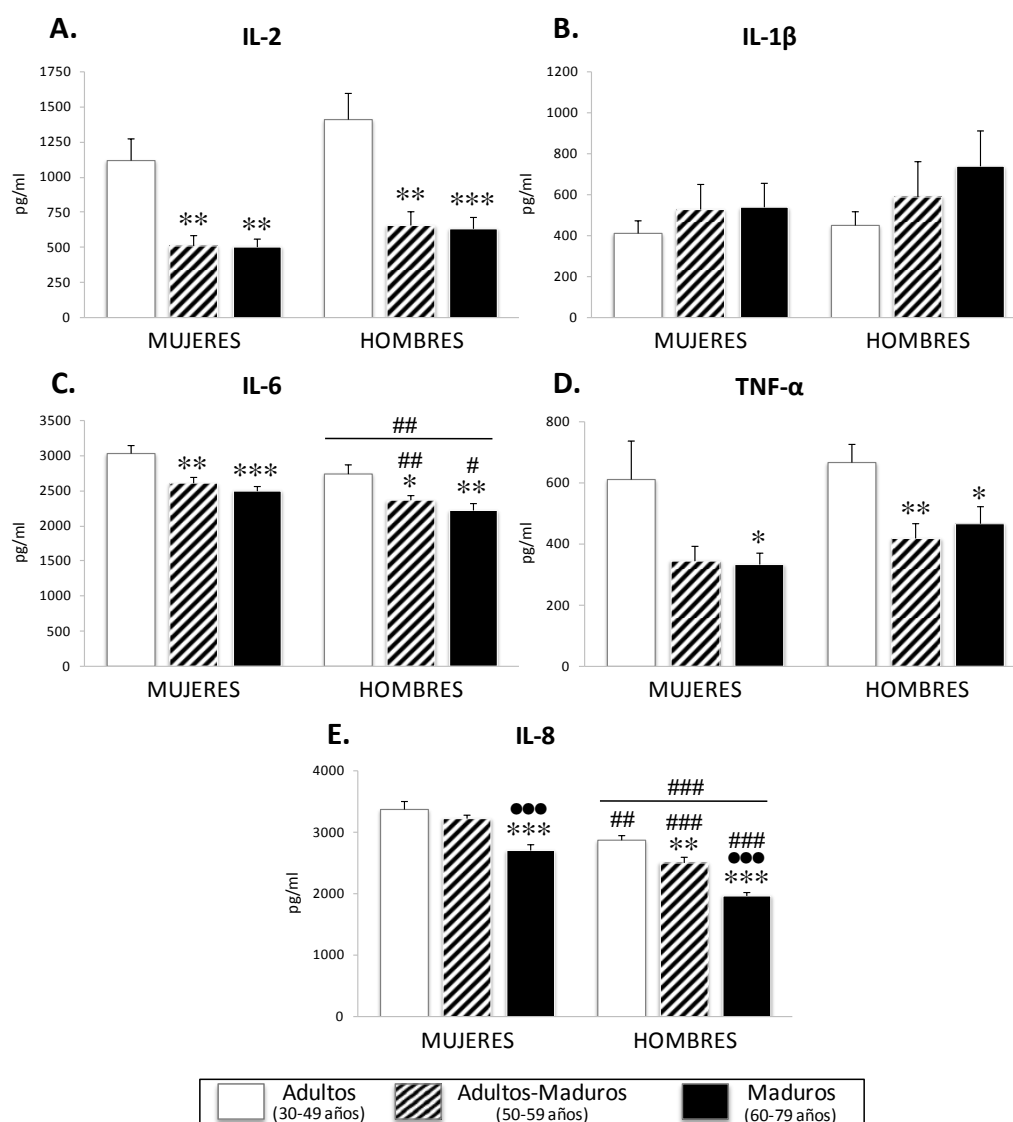
Con la edad, se observó una disminución ( $P \leq 0,001$ ) de los niveles de **IL-2**, tanto en individuos adultos-maduros como en maduros con respecto a adultos. Esta disminución se apreció tanto en mujeres como en hombres adultos-maduros ( $P \leq 0,01$ ) y maduros ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,001$ , respectivamente) en comparación con los adultos (Fig. 10A). No se encontraron diferencias en los valores de IL-2 entre mujeres ( $713 \pm 74$  pg/ml) y hombres ( $900 \pm 72$  pg/ml) al omitir el factor edad. En los niveles de **IL-1 $\beta$** , los maduros mostraron una tendencia hacia niveles mayores que los adultos ( $P = 0,071$ ), aunque dicho aumento no fue significativo al realizar el análisis separando mujeres y hombres (Fig. 10B). Al analizar sólo el factor género, no se observaron diferencias en los valores de IL-1 $\beta$  entre mujeres ( $493 \pm 74$  pg/ml) y hombres ( $594 \pm 72$  pg/ml). Los factores edad y sexo ejercieron un fuerte efecto sobre los niveles de **IL-6**. Los hombres presentaron niveles menores ( $P \leq 0,01$ ) que las mujeres

( $2448 \pm 53$  pg/ml y  $2716 \pm 55$  pg/ml, respectivamente), especialmente en la edad adulta-madura ( $P \leq 0,01$ ) y madura ( $P \leq 0,05$ ). Además, los niveles de IL-6 disminuyeron ( $P \leq 0,001$ ) en la edad adulta-madura y madura en relación a la adulta, hecho que también se observó al analizar mujeres y hombres por separado ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,001$ , respectivamente en mujeres;  $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,01$ , respectivamente en hombres) (Fig. 10C). Los niveles de **TNF- $\alpha$** , aparecieron disminuidos tanto en la edad adulta-madura ( $P \leq 0,001$ ) como en la madura ( $P \leq 0,01$ ) con respecto a la adulta. Al analizar los factores edad y género conjuntamente, se observó una tendencia hacia niveles menores ( $P = 0,063$ ) en mujeres adultas-maduras y una disminución significativa ( $P \leq 0,05$ ) en maduras en comparación con adultas (Fig. 10D). En los hombres tuvo lugar una disminución de los valores en adultos-maduros ( $P \leq 0,01$ ) y maduros ( $P \leq 0,05$ ) en relación a adultos. El factor género por sí sólo no reveló diferencias en los niveles de TNF- $\alpha$  entre mujeres ( $430 \pm 41$  pg/ml) y hombres ( $517 \pm 40$  pg/ml). En los niveles de **IL-8**, se observó una fuerte influencia de los factores género y edad. Los hombres ( $2441 \pm 51$  pg/ml) mostraron niveles menores ( $P \leq 0,001$ ) que las mujeres ( $3099 \pm 52$  pg/ml). Dicha diferencia se apreció en todas las edades ( $P \leq 0,01$  en adultos, y  $P \leq 0,001$  en adultos-maduros y maduros) (Fig. 10E). Además, la edad madura mostró unos niveles inferiores ( $P \leq 0,001$ ) a la de los otros dos grupos de edades, y los adultos-maduros presentaron una tendencia hacia valores menores ( $P = 0,064$ ) con respecto a los adultos. Tanto en mujeres como en hombres maduros, los niveles de IL-8 fueron menores ( $P \leq 0,001$ ) con respecto a los adultos y los adultos-maduros, y aparecieron disminuidos ( $P \leq 0,01$ ) en los sujetos adultos-maduros en relación a los adultos sólo en hombres. Los niveles de **IL-10** no se pudieron determinar ya que fueron superiores que los de la curva patrón proporcionado por el kit comercial, mostrando niveles mayores a 2000 pg/ml en todas las edades de mujeres y hombres estudiadas.

**Tabla V.** Niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8 (pg/ml) en sobrenadantes de cultivos de linfocitos de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina (PHA) de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años).

Citoquinas (sobrenadantes cultivo PHA)	30-49 años	50-59 años	60-79 años
<b>IL-2 (pg/ml)</b>			
Población Total	<b>1263<math>\pm</math>86</b>	<b>588<math>\pm</math>96</b>	<b>569<math>\pm</math>85</b>
Mujeres	1116 $\pm$ 160	515 $\pm$ 70	507 $\pm$ 56
Hombres	1409 $\pm$ 190	661 $\pm$ 96	631 $\pm$ 84
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/ml)</b>			
Población Total	<b>431<math>\pm</math>86</b>	<b>558<math>\pm</math>96</b>	<b>640<math>\pm</math>85</b>
Mujeres	411 $\pm$ 64	527 $\pm$ 126	540 $\pm$ 114
Hombres	451 $\pm$ 69	590 $\pm$ 172	740 $\pm$ 170
<b>IL-6 (pg/ml)</b>			
Población Total	<b>2891<math>\pm</math>64</b>	<b>2494<math>\pm</math>71</b>	<b>2360<math>\pm</math>63</b>
Mujeres	3039 $\pm$ 101	2617 $\pm$ 67	2490 $\pm$ 69
Hombres	2743 $\pm$ 124	2371 $\pm$ 56	2229 $\pm$ 94
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>			
Población Total	<b>639<math>\pm</math>48</b>	<b>383<math>\pm</math>54</b>	<b>400<math>\pm</math>47</b>
Mujeres	612 $\pm$ 125	346 $\pm$ 47	334 $\pm$ 38
Hombres	666 $\pm$ 62	420 $\pm$ 49	466 $\pm$ 56
<b>IL-8 (pg/ml)</b>			
Población Total	<b>3120<math>\pm</math>63</b>	<b>2857<math>\pm</math>67</b>	<b>2334<math>\pm</math>60</b>
Mujeres	3374 $\pm$ 134	3216 $\pm$ 73	2707 $\pm$ 83
Hombres	2866 $\pm$ 74	2497 $\pm$ 100	1961 $\pm$ 65

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de 12-16 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.



**Figura 10.** Niveles de las citoquinas IL-2 (A), IL-1β (B), IL-6 (C), TNF-α (D) e IL-8 (E) (pg/ml) en sobrenadantes de cultivos de linfocitos de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina (PHA) de adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años), tanto mujeres como hombres. Cada columna representa la media ± el error estándar de 12-16 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. \*\*\* $P \leq 0,001$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos-maduros. ### $P \leq 0,001$ , ## $P \leq 0,01$ , # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.1.3.2. Niveles de IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-10 en plasma procedente de sangre estimulada previamente en ausencia/presencia de LPS

Los resultados obtenidos en relación a los niveles de las citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, en los plasmas procedentes de sangre estimulada previamente con lipopolisacárido (LPS), o *plasma (+)LPS*, y su control en ausencia del estímulo, o *plasma (-)LPS*, se muestran en la tabla VI y en la figura 11.

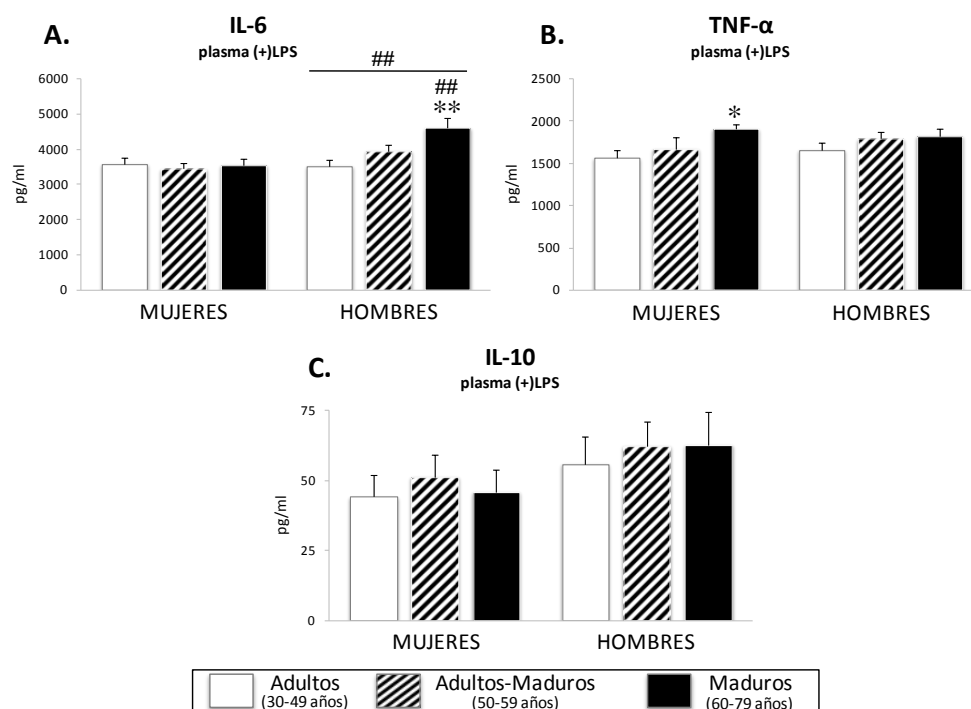
**Tabla VI.** Niveles de las citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 (pg/ml) en plasma de sangre periférica procedente de una incubación previa en ausencia/presencia de LPS (*plasma (-)LPS* y *plasma (+)LPS*, respectivamente), de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años).

Citoquinas (plasma +/- LPS)	30-49 años	50-59 años	60-79 años
<b>IL-6 (pg/ml)</b>			
• Plasma (-)LPS (n=12)	(n=12)	(n=12)	(n=12)
Población Total (n=36)	<b>21,3<math>\pm</math>4,1</b>	<b>28,3<math>\pm</math>3,4</b>	<b>27,7<math>\pm</math>3,4</b>
Mujeres (n=18)	21,3 $\pm$ 1,1	28,5 $\pm$ 3,3	22,4 $\pm$ 1,5
Hombres (n=18)	21,4 $\pm$ 0,8	28,0 $\pm$ 4,7	32,9 $\pm$ 9,3
• Plasma (+)LPS (n=43)	(n=43)	(n=43)	(n=43)
Población Total (n=129)	<b>3547<math>\pm</math>141</b>	<b>3698<math>\pm</math>141</b>	<b>4081<math>\pm</math>141</b>
Mujeres (n=65)	3576 $\pm$ 187	3460 $\pm$ 145	3556 $\pm$ 180
Hombres (n=64)	3518 $\pm$ 188	3935 $\pm$ 190	4607 $\pm$ 278
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>			
• Plasma (-)LPS (n=11)	(n=11)	(n=11)	(n=11)
Población Total (n=33)	<b>274<math>\pm</math>8</b>	<b>290<math>\pm</math>9</b>	<b>288<math>\pm</math>9</b>
Mujeres (n=16)	282 $\pm$ 16	297 $\pm$ 12	298 $\pm$ 13
Hombres (n=17)	267 $\pm$ 7	277 $\pm$ 11	279 $\pm$ 13
• Plasma (+)LPS (n=56)	(n=56)	(n=41)	(n=56)
Población Total (n=153)	<b>1612<math>\pm</math>60</b>	<b>1730<math>\pm</math>70</b>	<b>1868<math>\pm</math>60</b>
Mujeres (n=76)	1566 $\pm$ 86	1668 $\pm$ 141	1910 $\pm$ 57
Hombres (n=77)	1658 $\pm$ 86	1792 $\pm$ 74	1826 $\pm$ 84
<b>IL-10 (pg/ml)</b>			
• Plasma (-)LPS (n=12)	(n=12)	(n=10)	(n=12)
Población Total (n=34)	<b>&lt;1,3</b>	<b>&lt;1,3</b>	<b>&lt;1,3</b>
Mujeres (n=17)	<1,3	<1,3	<1,3
Hombres (n=17)	<1,3	<1,3	<1,3
• Plasma (+)LPS (n=18)	(n=18)	(n=18)	(n=18)
Población Total (n=54)	<b>50<math>\pm</math>6</b>	<b>57<math>\pm</math>6</b>	<b>54<math>\pm</math>7</b>
Mujeres (n=27)	45 $\pm$ 7	51 $\pm$ 8	46 $\pm$ 8
Hombres (n=27)	56 $\pm$ 10	62 $\pm$ 9	63 $\pm$ 12

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de los valores correspondientes al número de sujetos (n) indicado en cada grupo experimental y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

Los niveles de **IL-6** en el plasma (-)LPS fueron mayores en la edad adulta-madura ( $P \leq 0,05$ ) en relación a la adulta, sin embargo no se apreciaron diferencias significativas ni entre las mujeres ( $24,1 \pm 3,1$  pg/ml) y los hombres ( $27,4 \pm 2,9$  pg/ml), ni entre sus distintas edades. En los niveles de IL-6 en el plasma (+)LPS, los factores género y edad ejercieron un alto efecto ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,05$ , respectivamente), y se observó una interacción entre ambos factores ( $P \leq 0,05$ ). Los hombres ( $4020 \pm 116$  pg/ml) mostraron unos niveles mayores ( $P \leq 0,01$ ) que las mujeres ( $3531 \pm 115$  pg/ml), y especialmente en la edad madura ( $P \leq 0,01$ ) (Fig. 11A). Los niveles de IL-6 aumentaron ( $P \leq 0,05$ ) en individuos maduros con respecto a adultos. Al analizar mujeres y hombres por separado, en las mujeres no se encontraron cambios con la edad, mientras que en los hombres maduros tuvo lugar un aumento ( $P \leq 0,01$ ) de sus niveles en comparación con los adultos. Los niveles de **TNF- $\alpha$**  en el plasma (-)LPS, no presentaron cambios significativos con la edad, pero sí una tendencia ( $P = 0,07$ ) hacia niveles mayores en las mujeres ( $293 \pm 8$  pg/ml) con respecto a los hombres ( $274 \pm 6$  pg/ml). En el plasma (+)LPS, los niveles de TNF- $\alpha$  aparecieron aumentados con la edad ( $P \leq 0,05$ ). Los niveles fueron mayores en la edad madura que en la adulta ( $P \leq 0,01$ ). Dicho aumento sólo se apreció en las mujeres maduras en relación a las adultas ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 11B). Al omitir el factor edad, no se observaron diferencias entre mujeres ( $1715 \pm 52$  pg/ml) y hombres ( $1759 \pm 52$  pg/ml). Los niveles de **IL-10** fueron indetectables en el plasma (-)LPS, al ser inferiores al umbral mínimo de detección del kit comercial utilizado ( $< 1,3$  pg/ml). En los niveles de IL-10 en el plasma (+)LPS, los hombres ( $60 \pm 6$  pg/ml) mostraron una tendencia ( $P = 0,074$ ) hacia niveles mayores que las mujeres ( $47 \pm 4$  pg/ml). No se encontraron diferencias significativas con la edad (Fig. 11C).





**Figura 11.** Niveles (pg/ml) de las citoquinas IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B) e IL-10 (E) en el plasma de sangre periférica procedente de una estimulación previa con LPS (plasma (+)LPS) de una población compuesta por adultos (n=18-56), adultos-maduros (n=18-43) y maduros (n=18-56), tanto mujeres (n=27-76) como hombres (n=27-77). Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar, siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.  $**P \leq 0,01$ ,  $*P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos.  $^{##}P \leq 0,01$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.1.3.3. Niveles de sIL-6R, sTNF-RI y sTNF-RII en plasma procedente de sangre estimulada previamente con LPS

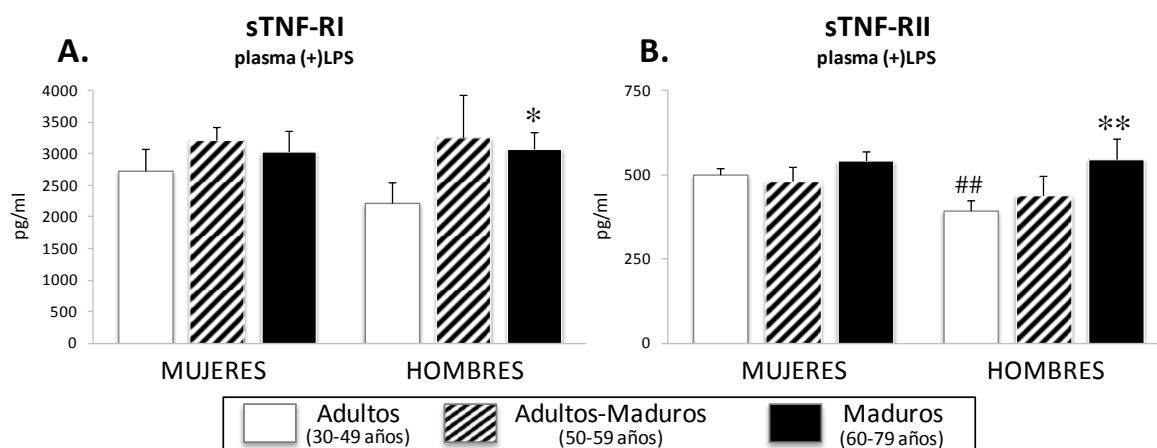
Los resultados obtenidos en relación a los niveles del receptor soluble de IL-6 (sIL-6R, del inglés *soluble interleukin-6 receptor*) y los receptores solubles I y II de TNF (sTNF-RI y II, del inglés *soluble tumour necrosis factor receptor I/II*) valorados en los plasmas procedentes de sangre estimulada previamente con lipopolisacárido (LPS), o *plasma (+)LPS*, se muestran en la tabla VII y en la figura 12.

**Tabla VII.** Niveles de los receptores solubles de citoquinas sIL-6R (ng/ml), sTNF-RI y -RII (pg/ml) en plasma de sangre periférica estimulada previamente con LPS, de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años).

Receptores de citoquinas (plasma +LPS)	30-49 años	50-59 años	60-79 años
<b>sIL-6R (ng/ml)</b>			
Población Total	33±2	32±3	30±2
Mujeres	34±2	34±3	34±4
Hombres	32±3	30±5	26±3
<b>sTNF-RI (pg/ml)</b>			
Población Total	2468±233	3231±234	3055±198
Mujeres	2733±353	3215±203	3037±319
Hombres	2232±306	3264±670	3072±265
<b>sTNF-RII (pg/ml)</b>			
Población Total	441±23	464±32	544±31
Mujeres	502±17	482±41	541±27
Hombres	395±28	438±57	547±62

Los resultados son la media ± el error estándar de 6-9 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de **sIL-6R** ni con el género (33,8±1,9 ng/ml en mujeres y 29,1±2,1 ng/ml en hombres) ni la edad de los sujetos estudiados. Los niveles de **sTNF-RI** aumentaron ( $P \leq 0,05$ ) en la edad adulta-madura y la madura en comparación con la adulta. Dicho aumento sólo fue significativo ( $P \leq 0,05$ ) en hombres maduros en relación a los adultos (Fig. 12A). Al analizar sólo el factor género, no se apreciaron diferencias entre mujeres (2972±178 pg/ml) y hombres (2723±214 pg/ml). En los niveles del receptor soluble II del TNF (**sTNF-RII**), se observó un aumento ( $P \leq 0,01$ ) de sus niveles en los individuos maduros con respecto a los adultos, y una tendencia ( $P = 0,075$ ) hacia niveles mayores en los primeros en comparación con los adultos-maduros. Al analizar los factores edad y género conjuntamente, dicho aumento sólo fue significativo ( $P \leq 0,01$ ) en los hombres maduros en relación a los adultos (Fig. 12B). El factor género por sí solo no mostró diferencias entre mujeres (512±17 pg/ml) y hombres (460±31 pg/ml), pero a la edad adulta los hombres presentaron niveles menores ( $P \leq 0,01$ ) que las mujeres.



**Figura 12.** Niveles (pg/ml) de los receptores solubles de citoquinas sTNF-RI (A) y –RII (B) en el plasma de sangre periférica procedente de una estimulación previa con LPS (plasma (+)LPS), de una población compuesta por adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años), tanto mujeres como hombres. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 6-9 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. ## $P \leq 0,01$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.1.4. Valoración de compuestos pro- y anti-inflamatorios plasmáticos

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en relación a los niveles de diversos compuestos pro-inflamatorios, PCR, IL-6 y sIL-6R, y anti-inflamatorios, IL-10, sTNF-RI y –RII, en plasma.

##### 4.1.4.1. Niveles de PCR, IL-6 y sIL-6R

Los resultados relativos a los niveles plasmáticos de una serie de compuestos pro-inflamatorios, como la proteína C reactiva (PCR), la interleuquina-6 (IL-6) y el receptor soluble de IL-6 (sIL-6R), se muestran en la tabla VIII y la figura 13.

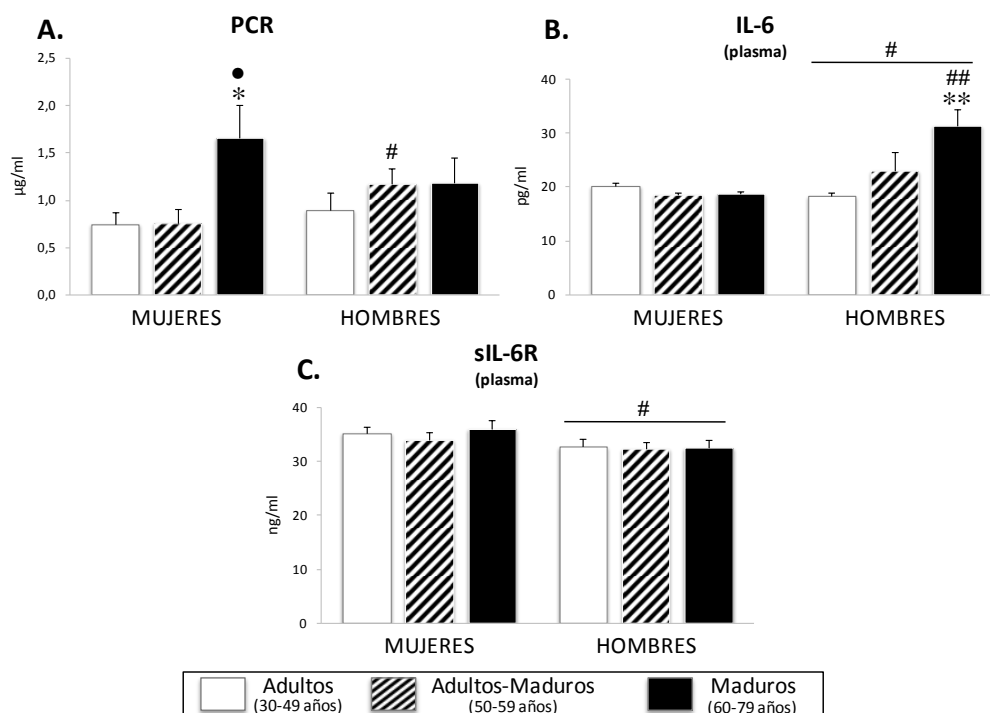
**Tabla VIII.** Niveles de PCR ( $\mu\text{g/ml}$ ), IL-6 ( $\text{pg/ml}$ ) y sIL-6R ( $\text{ng/ml}$ ) en plasma de sangre periférica de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años).

Compuestos proinflamatorios (plasma)	30-49 años	50-59 años	60-79 años
<b>PCR (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	(n=45)	(n=48)	(n=50)
<b>Población Total</b> (n=143)	<b>0,82<math>\pm</math>0,17</b>	<b>0,96<math>\pm</math>0,16</b>	<b>1,42<math>\pm</math>0,16</b>
<b>Mujeres</b> (n=71)	0,74 $\pm$ 0,13	0,75 $\pm$ 0,16	1,66 $\pm$ 0,34
<b>Hombres</b> (n=72)	0,89 $\pm$ 0,19	1,17 $\pm$ 0,16	1,18 $\pm$ 0,27
<b>IL-6 (<math>\text{pg/ml}</math>)</b>	(n=11)	(n=11)	(n=11)
<b>Población Total</b> (n=33)	<b>19,3<math>\pm</math>0,5</b>	<b>20,9<math>\pm</math>1,9</b>	<b>25,6<math>\pm</math>2,6</b>
<b>Mujeres</b> (n=16)	20,2 $\pm$ 0,6	18,6 $\pm$ 0,4	18,8 $\pm$ 0,4
<b>Hombres</b> (n=17)	18,3 $\pm$ 0,6	23,0 $\pm$ 3,4	31,3 $\pm$ 3,1
<b>sIL-6R (<math>\text{ng/ml}</math>)</b>	(n=69)	(n=69)	(n=68)
<b>Población Total</b> (n=206)	<b>34,1<math>\pm</math>0,9</b>	<b>33,3<math>\pm</math>0,9</b>	<b>34,3<math>\pm</math>0,9</b>
<b>Mujeres</b> (n=103)	35,3 $\pm$ 1,2	34,1 $\pm$ 1,3	36,0 $\pm$ 1,6
<b>Hombres</b> (n=103)	32,9 $\pm$ 1,4	32,4 $\pm$ 1,3	32,6 $\pm$ 1,4

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de los valores correspondientes al número de sujetos (n) indicado en cada grupo experimental y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de **PCR** entre mujeres (1,05 $\pm$ 0,13  $\mu\text{g/ml}$ ) y hombres (1,08 $\pm$ 0,13  $\mu\text{g/ml}$ ) de la población total, pero sí en la edad adulta-madura, donde los hombres presentaron niveles mayores ( $P\leq 0,05$ ) que las mujeres (Fig. 13A). Los sujetos maduros mostraron unos niveles mayores ( $P\leq 0,05$ ) con respecto a los adultos, diferencia que sólo fue observada en el grupo de las mujeres. Además, en las mujeres maduras se observó un aumento ( $P\leq 0,05$ ) de los niveles de PCR en relación a las adultas-maduras. En los hombres sólo se apreció una tendencia hacia niveles mayores ( $P=0,074$ ) en los adultos-maduros en comparación con los adultos. Los niveles de **IL-6** en plasma aumentaron ( $P\leq 0,05$ ) en la edad madura con respecto a la adulta. Al analizar los factores género y edad conjuntamente, dicho aumento sólo tuvo lugar en los hombres de manera muy significativa ( $P\leq 0,01$ ) (Fig. 13B), mientras que en las mujeres se observó una tendencia hacia niveles menores de IL-6, tanto en las adultas-maduras ( $P=0,077$ ) como en las maduras ( $P=0,094$ ) en relación a las adultas. Cabe destacar que los hombres en general mostraron unos niveles mayores ( $P\leq 0,05$ ) que las mujeres (24,5 $\pm$ 2,0 y 19,2 $\pm$ 0,3  $\text{pg/ml}$ , respectivamente), y especialmente en la edad madura ( $P\leq 0,01$ ). Por el contrario, en la edad adulta los hombres presentaron una tendencia hacia niveles menores ( $P=0,057$ ) que las mujeres. En cuanto a los niveles plasmáticos de **sIL-6R**, no se encontraron diferencias

significativas entre los distintos grupos de edades, pero sí entre los niveles de las mujeres ( $35,1 \pm 0,8$  ng/ml) y los hombres ( $32,6 \pm 0,8$  ng/ml) de la población total, siendo menores ( $P \leq 0,05$ ) en los segundos (Fig. 13C).



**Figura 13.** Niveles de PCR ( $\mu\text{g/ml}$ ) (A), IL-6 (pg/ml) (B) y sIL-6R (ng/ml) (C) en plasma de sangre periférica de una población compuesta por adultos ( $n=11-69$ ), adultos-maduros ( $n=11-69$ ) y maduros ( $n=11-68$ ), tanto mujeres ( $n=16-103$ ) como hombres ( $n=17-103$ ). Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar, siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos-maduros. ## $P \leq 0,01$ , # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.1.4.2. Niveles de IL-10, sTNF-RI y -RII

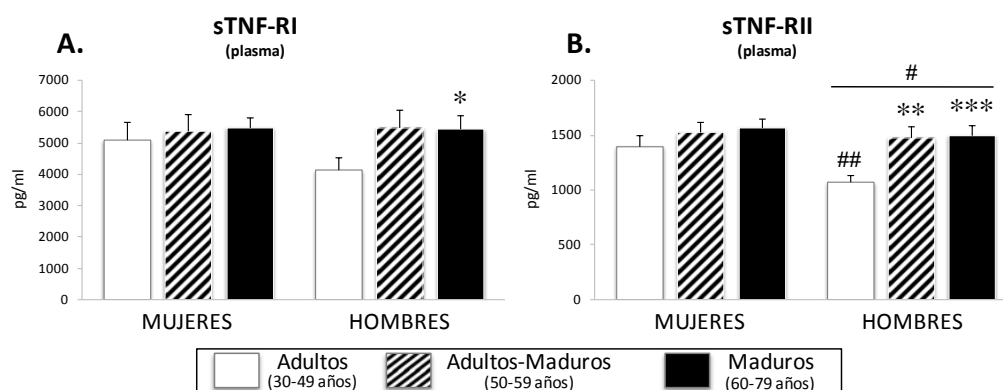
Los resultados relativos a los niveles plasmáticos de dos compuestos anti-inflamatorios, el receptor soluble I y II de TNF (sTNF-RI y -RII), se muestran en la tabla IX y la figura 14.

**Tabla IX.** Niveles de sTNF-RI y -RII (pg/ml) en plasma de sangre periférica de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años).

Compuestos antiinflamatorios (plasma)	30-49 años	50-59 años	60-79 años
<b>sTNF-RI (pg/ml)</b>	(n=17)	(n=10)	(n=16)
<b>Población Total</b> (n=43)	<b>4617±293</b>	<b>5427±427</b>	<b>5468±302</b>
<b>Mujeres</b> (n=21)	5102±549	5365±544	5483±331
<b>Hombres</b> (n=22)	4132±393	5486±568	5454±408
<b>sTNF-RII (pg/ml)</b>	(n=35)	(n=41)	(n=44)
<b>Población Total</b> (n=120)	<b>1236±65</b>	<b>1502±61</b>	<b>1529±59</b>
<b>Mujeres</b> (n=65)	1396±98	1527±88	1563±79
<b>Hombres</b> (n=55)	1076±55	1477±100	1495±91

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de los valores correspondientes al número de sujetos (n) indicado en cada grupo experimental y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

No se pudieron cuantificar los niveles de **IL-10** en plasma ya que fueron inferiores al umbral mínimo de detección del kit comercial empleado ( $<1,3$  pg/ml). No se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de **sTNF-RI** entre hombres ( $5024\pm280$  pg/ml) y mujeres ( $5317\pm284$  pg/ml) de la población total. En la edad madura se observó un aumento ( $P\leq0,05$ ) de los niveles de sTNF-RI con respecto a la adulta. Dicho aumento sólo se apreció en hombres ( $P\leq0,05$ ) (Fig. 14A), además de una tendencia hacia unos niveles mayores ( $P=0,08$ ) en los hombres adultos-maduros en comparación con los adultos. Los niveles del receptor II de TNF (**sTNF-RII**) aumentaron tanto en adultos-maduros como en maduros en relación a adultos ( $P\leq0,01$  y  $P\leq0,001$ , respectivamente). Estas diferencias sólo fueron significativas en los hombres, con el mismo grado de significación (Fig. 14B). Además, los hombres ( $1349\pm52$  pg/ml) presentaron valores menores ( $P\leq0,05$ ) que las mujeres ( $1495\pm49$  pg/ml), y especialmente en la edad adulta ( $P\leq0,01$ ).



**Figura 14.** Niveles (pg/ml) de sTNF-RI (A) y –RII (B) en plasma de sangre periférica de una población compuesta por adultos (n=17-35), adultos-maduros (n=10-41) y maduros (n=16-44), tanto mujeres (n=21-65) como hombres (n=22-55). Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar, siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. ## $P \leq 0,01$ , # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.1.5. Valoración de compuestos oxidantes y defensas antioxidantes

Seguidamente, se presentan los resultados obtenidos en relación a diversos parámetros de compuestos oxidantes (GSSG, ratio GSSG/GSH y actividad xantina oxidasa), y de defensas antioxidantes (GSH y capacidad antioxidante total).

##### 4.1.5.1. Oxidantes: Contenido de GSSG y cociente GSSG/GSH en neutrófilos y linfocitos, y actividad xantina oxidasa plasmática

Los resultados obtenidos en relación a los niveles de diferentes compuestos oxidantes, como son los niveles de GSSG y la relación GSSG/GSH tanto en neutrófilos como en linfocitos, y la actividad plasmática de la enzima xantina oxidasa, se muestran en la tabla X y en la figura 15.

En los niveles de **GSSG en neutrófilos**, no se encontraron diferencias significativas entre hombres ( $1,65 \pm 0,11$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) y mujeres ( $1,52 \pm 0,10$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína). En la edad madura tuvo lugar un aumento ( $P \leq 0,01$ ) de sus niveles con respecto a la adulta. El análisis por género y edad mostró unos niveles mayores en mujeres adultas-maduras ( $P \leq 0,05$ ) y maduras ( $P \leq 0,01$ ) en comparación con las adultas, y en hombres maduros ( $P \leq 0,05$ ) con respecto a los adultos-maduros (Fig. 15A). En cuanto a los niveles de GSSG **en linfocitos**, al omitir el factor edad, en los hombres ( $1,33 \pm 0,07$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) se apreció una tendencia

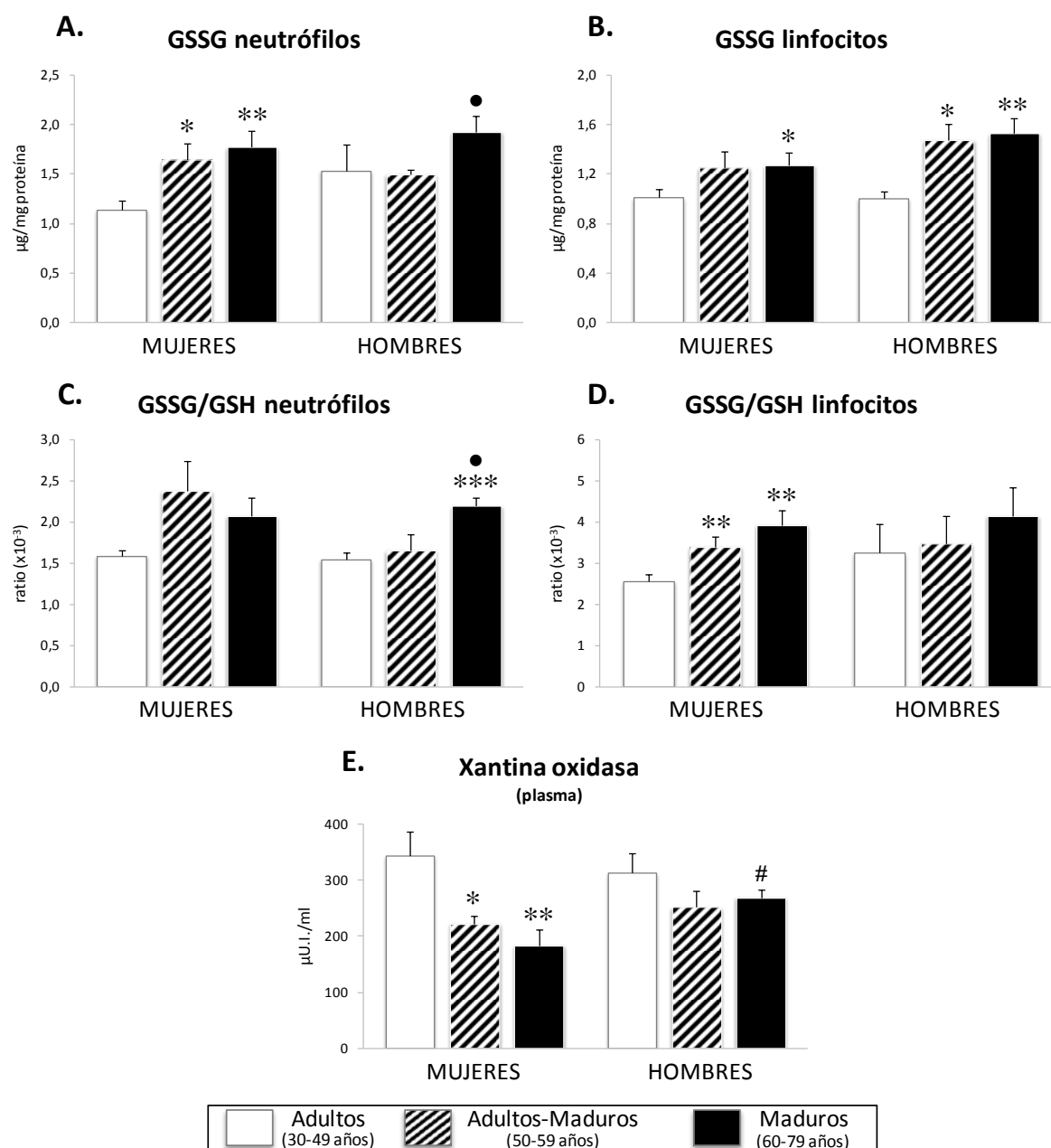
( $P=0,091$ ) hacia unos niveles mayores que en las mujeres ( $1,18\pm0,06$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína). Los niveles aumentaron en los adultos-maduros ( $P\leq0,01$ ) y en los maduros ( $P\leq0,001$ ) de la población total en relación a los adultos. En los hombres, dicho aumento se observó en la edad adulta-madura ( $P\leq0,05$ ) y madura ( $P\leq0,01$ ) en comparación con la adulta (Fig. 15B), mientras que las mujeres adultas-maduras mostraron una tendencia ( $P=0,091$ ) hacia unos niveles mayores y sólo resultaron ser significativos ( $P\leq0,05$ ) en la edad madura. La relación GSSG/GSH en neutrófilos fue mayor en los adultos-maduros ( $P=0,066$ ) y maduros ( $P=0,001$ ) con respecto a los adultos. El factor género no ejerció diferencias significativas sobre sus niveles (ratio  $\times 10^{-3}$ :  $1,80\pm0,13$  en hombres y  $2,01\pm0,12$  en mujeres). Al analizar los factores género y edad conjuntamente, en las mujeres, sólo se observaron tendencias hacia unos niveles mayores en las adultas-maduras ( $P=0,08$ ) y las maduras ( $P=0,095$ ) en relación a las adultas. En los hombres, en cambio, se encontraron unos valores mayores en los maduros en comparación con los adultos ( $P\leq0,001$ ) y los adultos-maduros ( $P\leq0,05$ ) (Fig. 15C). La relación GSSG/GSH en linfocitos mostró valores similares entre hombres (ratio  $\times 10^{-3}$ :  $3,62\pm0,29$ ) y mujeres (ratio  $\times 10^{-3}$ :  $3,30\pm0,23$ ). En la edad madura tuvo lugar un aumento ( $P\leq0,05$ ) con respecto a la adulta, diferencia que sólo fue observada en las mujeres adultas-maduras ( $P\leq0,01$ ) y maduras ( $P\leq0,01$ ) con respecto a las adultas (Fig. 15D). La actividad plasmática de la enzima **xantina oxidasa** disminuyó tanto en los individuos adultos-maduros ( $P\leq0,01$ ) como en los maduros ( $P\leq0,01$ ) en relación a los adultos. Al analizar ambos sexos por separado, dicha disminución sólo se apreció en las mujeres, significativamente ( $P\leq0,05$ ) en las adultas-maduras, y muy significativamente ( $P\leq0,01$ ) en las maduras (Fig. 15E). No se observaron diferencias significativas entre mujeres ( $250\pm17$   $\mu\text{U.I.}/\text{ml}$ ) y hombres ( $278\pm17$   $\mu\text{U.I.}/\text{ml}$ ) de la población total, pero sí en la edad madura, donde los hombres mostraron una mayor ( $P\leq0,05$ ) actividad que las mujeres.



**Tabla X.** Niveles de GSSG ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) y relación GSSG/GSH en neutrófilos y linfocitos de sangre periférica, y actividad plasmática de la enzima xantina oxidasa ( $\mu\text{U.l.}/\text{ml}$ ) de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años).

Compuestos oxidantes	30-49 años	50-59 años	60-79 años
<b>GSSG neutrófilos (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math> proteína)</b>			
Población Total	<b>1,33<math>\pm</math>0,13</b>	<b>1,57<math>\pm</math>0,14</b>	<b>1,85<math>\pm</math>0,11</b>
Mujeres	1,13 $\pm$ 0,10	1,65 $\pm$ 0,16	1,79 $\pm$ 0,15
Hombres	1,53 $\pm$ 0,27	1,50 $\pm$ 0,05	1,93 $\pm$ 0,16
<b>GSSG linfocitos (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math> proteína)</b>			
Población Total	<b>1,00<math>\pm</math>0,08</b>	<b>1,36<math>\pm</math>0,08</b>	<b>1,40<math>\pm</math>0,07</b>
Mujeres	1,01 $\pm$ 0,07	1,25 $\pm$ 0,13	1,27 $\pm$ 0,11
Hombres	1,00 $\pm$ 0,06	1,47 $\pm$ 0,14	1,53 $\pm$ 0,13
<b>RATIO GSSG/GSH (<math>\times 10^{-3}</math>; neutrófilos)</b>			
Población Total	<b>1,56<math>\pm</math>0,15</b>	<b>2,01<math>\pm</math>0,17</b>	<b>2,14<math>\pm</math>0,13</b>
Mujeres	1,58 $\pm$ 0,07	2,37 $\pm$ 0,37	2,07 $\pm$ 0,23
Hombres	1,55 $\pm$ 0,08	1,66 $\pm$ 0,19	2,20 $\pm$ 0,10
<b>RATIO GSSG/GSH (<math>\times 10^{-3}</math>; linfocitos)</b>			
Población Total	<b>2,91<math>\pm</math>0,31</b>	<b>3,45<math>\pm</math>0,34</b>	<b>4,03<math>\pm</math>0,31</b>
Mujeres	2,57 $\pm$ 0,16	3,40 $\pm$ 0,24	3,93 $\pm$ 0,35
Hombres	3,26 $\pm$ 0,68	3,49 $\pm$ 0,65	4,13 $\pm$ 0,70
<b>Xantina oxidasa plasmática (<math>\mu\text{U.l.}/\text{ml}</math>)</b>			
Población Total	<b>329<math>\pm</math>20</b>	<b>238<math>\pm</math>21</b>	<b>226<math>\pm</math>20</b>
Mujeres	344 $\pm$ 43	223 $\pm$ 14	184 $\pm$ 29
Hombres	313 $\pm$ 35	253 $\pm$ 29	269 $\pm$ 15

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de 7-15 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.



**Figura 15.** Niveles de GSSG ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) y relación GSSG/GSH en neutrófilos (A y C, respectivamente) y linfocitos (B y D, respectivamente) de sangre periférica, y actividad plasmática de la enzima xantina oxidasa ( $\mu\text{U.I.}/\text{ml}$ ) (E) de una población compuesta por adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años), tanto mujeres como hombres. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-15 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. • $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos-maduros. # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.1.5.2. Defensas antioxidantes: Niveles de GSH en neutrófilos y linfocitos, glutatión total en plasma, y capacidad antioxidante total en plasma y células sanguíneas

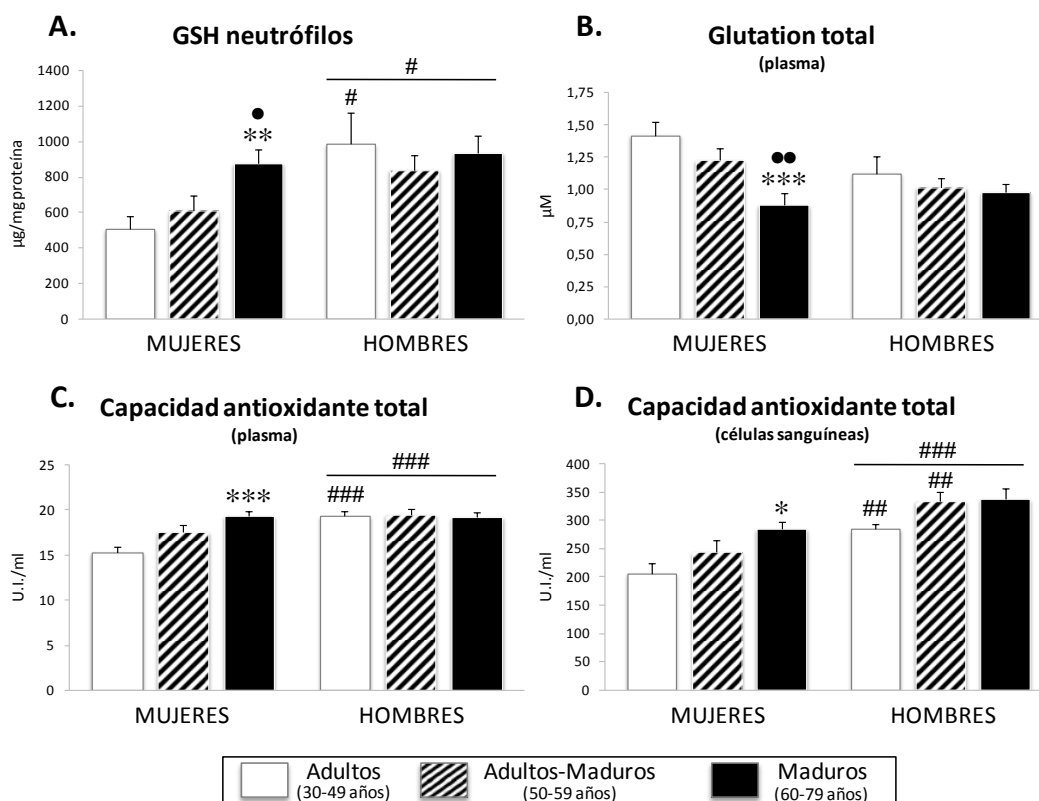
Los resultados obtenidos en relación a los niveles de diferentes compuestos antioxidantes, como son el contenido de GSH en neutrófilos y linfocitos, niveles de glutatión total en plasma, y la capacidad antioxidante total en plasma y células sanguíneas, se muestran en la tabla XI y en la figura 16.

**Tabla XI.** Niveles de GSH ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) en neutrófilos y linfocitos de sangre periférica, glutatión total ( $\mu\text{M}$ ) en plasma, y capacidad antioxidante total (U.I./ml) en plasma y células sanguíneas de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años).

Defensas antioxidantes	30-49 años	50-59 años	60-79 años
<b>GSH neutrófilos (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math> proteína)</b>			
Población Total	<b>747<math>\pm</math>76</b>	<b>723<math>\pm</math>84</b>	<b>904<math>\pm</math>66</b>
Mujeres	509 $\pm$ 70	612 $\pm$ 80	875 $\pm$ 81
Hombres	985 $\pm$ 174	834 $\pm$ 88	933 $\pm$ 99
<b>GSH linfocitos (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math> proteína)</b>			
Población Total	<b>437<math>\pm</math>34</b>	<b>416<math>\pm</math>37</b>	<b>338<math>\pm</math>33</b>
Mujeres	431 $\pm$ 39	366 $\pm$ 30	341 $\pm$ 42
Hombres	442 $\pm$ 67	466 $\pm$ 76	335 $\pm$ 50
<b>Glutacion total en plasma (<math>\mu\text{M}</math>)</b>			
Población Total	<b>1,27<math>\pm</math>0,07</b>	<b>1,12<math>\pm</math>0,07</b>	<b>0,93<math>\pm</math>0,07</b>
Mujeres	1,42 $\pm$ 0,10	1,23 $\pm$ 0,09	0,88 $\pm$ 0,09
Hombres	1,12 $\pm$ 0,14	1,02 $\pm$ 0,07	0,98 $\pm$ 0,06
<b>Capacidad antioxidantes total en plasma (U.I./ml)</b>			
Población Total	<b>17,3<math>\pm</math>0,4</b>	<b>18,5<math>\pm</math>0,4</b>	<b>19,2<math>\pm</math>0,5</b>
Mujeres	15,3 $\pm$ 0,6	17,6 $\pm$ 0,7	19,3 $\pm$ 0,6
Hombres	19,3 $\pm$ 0,6	19,5 $\pm$ 0,6	19,2 $\pm$ 0,6
<b>Capacidad antioxidantes total en células sanguíneas (U.I./ml)</b>			
Población Total	<b>246<math>\pm</math>11</b>	<b>290<math>\pm</math>11</b>	<b>311<math>\pm</math>11</b>
Mujeres	206 $\pm$ 18	245 $\pm$ 19	285 $\pm$ 13
Hombres	285 $\pm$ 9	335 $\pm$ 15	338 $\pm$ 19

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de 7-17 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

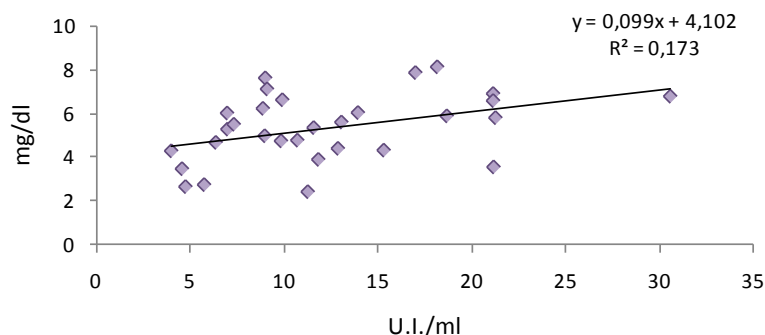
En el contenido de **GSH en neutrófilos** se observó un aumento ( $P \leq 0,05$ ) en la edad madura con respecto a la adulta-madura. Las diferencias debidas a la edad sólo fueron significativas en las mujeres (Fig. 16A), donde las maduras presentaron unos niveles mayores que las adultas ( $P \leq 0,01$ ) y las adultas-maduras ( $P \leq 0,05$ ). Además, en los hombres ( $917 \pm 64$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) se encontraron unos valores mayores ( $P \leq 0,05$ ) que en las mujeres ( $665 \pm 59$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína), siendo especialmente apreciable en la edad adulta ( $P \leq 0,05$ ). Los niveles de **GSH en linfocitos** fueron similares en hombres ( $414 \pm 31$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) y mujeres ( $379 \pm 25$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína), al omitir el factor edad. Los maduros de la población total mostraron unos niveles menores ( $P \leq 0,05$ ) que los adultos. Los niveles plasmáticos de **glutación total** disminuyeron en los individuos maduros con respecto a los adultos ( $P \leq 0,001$ ) y los adultos-maduros ( $P \leq 0,05$ ). Esta disminución sólo se apreció en las mujeres maduras en relación a las adultas ( $P \leq 0,001$ ) y las adultas-maduras ( $P \leq 0,01$ ) (Fig. 16B). Los hombres ( $1,04 \pm 0,06$   $\mu\text{M}$ ) presentaron una tendencia hacia niveles menores ( $P = 0,073$ ) en comparación con las mujeres ( $1,18 \pm 0,05$   $\mu\text{M}$ ) de la población total, sobretodo en la edad adulta ( $P = 0,076$ ) y adulta-madura ( $P = 0,076$ ). Tanto el factor edad ( $P \leq 0,05$ ) como el género ( $P \leq 0,001$ ) influyeron sobre la **capacidad antioxidante total plasmática** (Fig. 16C), y se observó una interacción ( $P \leq 0,01$ ) entre ambos factores. En los sujetos maduros los valores fueron mayores ( $P \leq 0,01$ ) que en los adultos, aumento que sólo se mostró en mujeres de manera altamente significativa ( $P \leq 0,001$ ). En hombres ( $19,3 \pm 0,4$  U.I./ml) se apreciaron unos niveles mayores que en mujeres ( $17,4 \pm 0,4$  U.I./ml), especialmente en la edad adulta ( $P \leq 0,001$ ). Los factores sexo y edad ejercieron un alto efecto ( $P \leq 0,001$ ) sobre la capacidad antioxidante total de las **células sanguíneas**. Los hombres ( $319 \pm 9$  U.I./ml) presentaron unos niveles mayores ( $P \leq 0,001$ ) que las mujeres ( $245 \pm 9$  U.I./ml), especialmente en la edad adulta ( $P \leq 0,01$ ) y adulta-madura ( $P \leq 0,01$ ) (Fig. 16D). Además, los niveles aumentaron en adultos-maduros ( $P \leq 0,05$ ) y maduros ( $P \leq 0,001$ ) con respecto a individuos adultos de la población total. Al analizar mujeres y hombres por separado, dicho aumento sólo se mostró en las mujeres maduras en relación a las adultas ( $P \leq 0,05$ ), y se apreció una tendencia ( $P = 0,086$ ) hacia niveles mayores en hombres adultos-maduros en comparación con adultos.



**Figura 16.** Niveles de GSH (µg/mg proteína) en neutrófilos (A) de sangre periférica, glutatión total (µM) en plasma (B), y capacidad antioxidante total (U.I./ml) en plasma (C) y células sanguíneas (D) de una población compuesta por adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años), tanto mujeres como hombres. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-17 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos-maduros. ### $P \leq 0,001$ , ## $P \leq 0,01$ , # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

Debido al resultado inesperado obtenido en los niveles de antioxidantes totales plasmáticos con el envejecimiento, los cuales aumentaban con la edad, se procedió a valorar los niveles de ácido úrico, importante agente reductor, en el plasma de 30 individuos (15 mujeres y 15 hombres) empleados en las mediciones de los antioxidantes totales. El análisis de *Pearson* reveló una correlación positiva (coeficiente de correlación ( $r$ ) = 0,416;  $P \leq 0,05$ ) entre los niveles de antioxidantes totales y los de ácido úrico, observando un aumento en estos últimos a mayores niveles de antioxidantes (Fig. 17). Además, los hombres presentaron, en general, unos mayores niveles ( $P \leq 0,001$ ) de ácido úrico ( $0,63 \pm 0,09$  mg/dl) que las mujeres ( $0,44 \pm 0,13$  mg/dl).

### Capacidad antioxidante total vs. Ácido úrico



**Figura 17.** Correlación entre los niveles plasmáticos de antioxidantes totales (U.I./ml) y de ácido úrico (mg/dl) de una población compuesta por adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años), tanto mujeres (n=15) como hombres (n=15). Cada punto representa el valor de antioxidantes totales (eje abscisas) y de ácido úrico (eje ordenadas) de un total de 30 coordenadas correspondientes a ese mismo número de sujetos. A mayores niveles de antioxidantes totales se observó un aumento en los niveles de ácido úrico ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.1.6. Daño oxidativo: Niveles de 8-isoprostano en plasma

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en relación a los niveles de 8-isoprostano en plasma (tabla XII y figura 18).

**Tabla XII.** Niveles de 8-isoprostano (pg/ml) en plasma de sangre periférica de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años).

	30-49 años	50-59 años	60-79 años
<b>8-Isoprostano (pg/ml)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>12,5±2,4</b>	<b>22,4±6,1</b>	<b>154,6±27,1</b>
<b>Mujeres</b>	14,9±3,5	13,8±4,6	90,6±36,6
<b>Hombres</b>	9,1±2,6	28,1±9,3	207,9±32,9

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

Los niveles de 8-isoprostano aumentaron ( $P \leq 0,001$ ) en la edad madura con respecto a la adulta y adulta-madura. Dichos aumentos se apreciaron en los hombres, con el mismo grado de significación (Fig. 18), mientras que en mujeres se observó una tendencia ( $P=0,069$ ) hacia niveles mayores en las maduras en relación a las adultas. Por otro lado, los hombres ( $118 \pm 26$

pg/ml) presentaron unos niveles mayores ( $P \leq 0,05$ ) que las mujeres ( $49 \pm 18$  pg/ml), especialmente en la edad madura ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 18.** Niveles de 8-isoprostano (pg/ml) en plasma de sangre periférica de una población compuesta por adultos (30-49 años), adultos-maduros (50-59 años) y maduros (60-79 años), tanto mujeres como hombres. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. \*\*\* $P \leq 0,001$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos-maduros. # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

## 4.2. RITMOS BIOLÓGICOS EN EL SISTEMA INMUNITARIO

A continuación, se exponen los resultados relativos a las variaciones circadianas y circanuales de la funcionalidad del sistema inmunológico en un grupo constituido por hombres y mujeres, y dividido en diferentes edades.

### 4.2.1. Cambios en la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica en dos horas distintas del día

La valoración de la funcionalidad de las células inmunológicas se realizó en dos horas distintas del día, a las 10:00h y a las 15:00h, en dos grupos de edades: jóvenes de 20-29 años y septuagenarios (70-79 años).

#### 4.2.1.1. Cambios en las funciones de neutrófilos: Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares

Los resultados relativos a las funciones estudiadas en neutrófilos se muestran en la tabla XIII y en la figura 19.

Los índices de **adherencia** en neutrófilos, tanto de sujetos jóvenes como de septuagenarios, no mostraron cambios significativos entre las 10:00h y las 15:00. Al comparar los valores entre jóvenes y septuagenarios, la adherencia fue mayor ( $P \leq 0,001$ ) en los segundos a las 15:00h (Fig. 19A). Los índices de **quimiotaxis** (Fig. 19B) disminuyeron ( $P \leq 0,01$ ) a las 15:00h en relación a las 10:00h en ambos grupos de edad. No se observaron diferencias significativas entre las 10:00h y las 15:00h, ni en el índice ni en la eficacia de fagocitosis de jóvenes y septuagenarios. En ambos parámetros, los septuagenarios mostraron unos niveles inferiores a la de los adultos, siendo altamente significativo ( $P \leq 0,001$ ) tanto a las 10:00h como a las 15:00h. En cuanto al contenido intracelular de anión superóxido en condiciones basales (Fig. 19C), en los jóvenes tuvo lugar una disminución ( $P \leq 0,001$ ) de sus niveles a las 15:00h al compararlos con las 10:00h, mientras que en los septuagenarios no se apreció ningún cambio. Por el contrario, en condiciones estimuladas (Fig. 19D) se observó una disminución ( $P \leq 0,05$ ) de la producción intracelular de los niveles de anión superóxido en los individuos septuagenarios a las 15:00h en relación a las 10:00h,

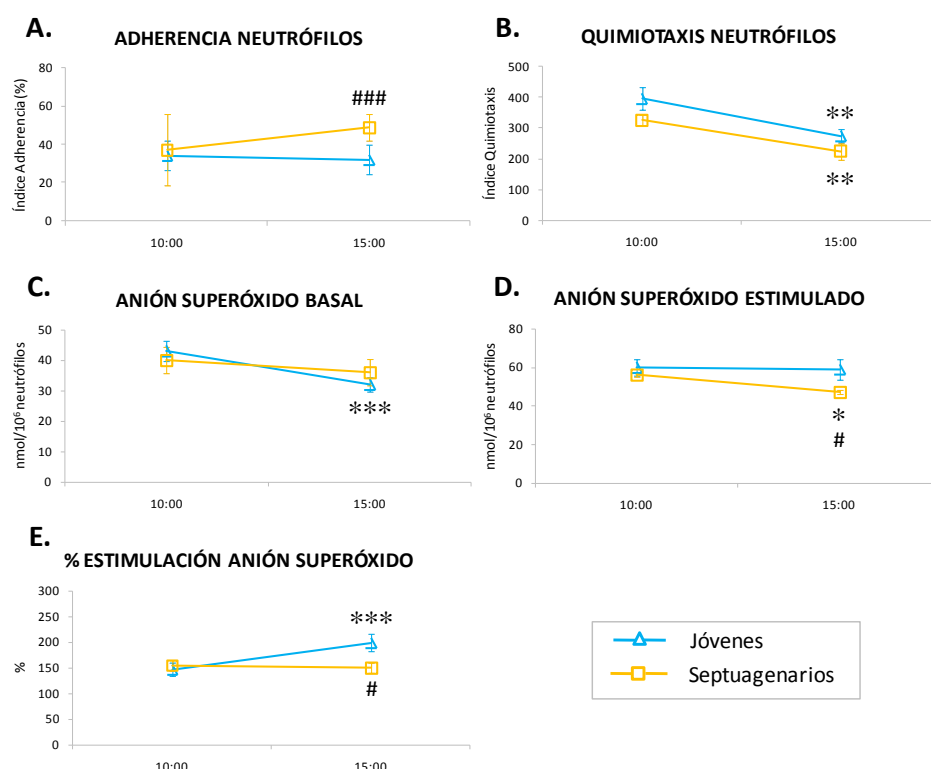


cambio que no tuvo lugar en los jóvenes. Así, al comparar a las 15:00h los niveles entre jóvenes y septuagenarios, en estos últimos resultaron ser menores ( $P \leq 0,05$ ). El porcentaje de estimulación de anión superóxido intracelular, parámetro obtenido de la relación entre los niveles en condiciones basales, a la que se les da el valor 100, y estimuladas, apareció aumentado ( $P \leq 0,001$ ) en los sujetos jóvenes a las 15:00h en relación a las 10:00h, pero no se modificó en los septuagenarios. Al comparar estos porcentajes entre jóvenes y septuagenarios, estos últimos presentaron valores menores ( $P \leq 0,05$ ) a las 15:00h (Fig. 19E).

**Tabla XIII.** Índice de adherencia (% neutrófilos adherentes), índice de quimiotaxis (número de neutrófilos en filtro), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 neutrófilos), eficacia de fagocitosis (número de neutrófilos que han fagocitado/100 neutrófilos) y niveles de anión superóxido intracelular (nmol/ $10^6$  neutrófilos) en condiciones basales y estimuladas, y el porcentaje de estimulación (%) en los niveles de anión superóxido, de neutrófilos de sangre periférica de jóvenes (20-29 años) y septuagenarios (70-79 años) en dos horas distintas del día, a las 10:00h y a las 15:00h.

Función Neutrófilos	10:00h	15:00h
<b>Índice de adherencia (%)</b>		
Jóvenes	34±8	32±8
Septuagenarios	37±19	49±7
<b>Índice de quimiotaxis (nº neutrófilos)</b>		
Jóvenes	397±38	275±21
Septuagenarios	326±16	224±25
<b>Índice de fagocitosis (nº bolas látex)</b>		
Jóvenes	845±33	828±50
Septuagenarios	383±40	353±17
<b>Eficacia de fagocitosis (%)</b>		
Jóvenes	91±2	90±2
Septuagenarios	55±4	51±2
<b>Niveles de anión superóxido intracelular</b>		
<b>- Basal (nmol/<math>10^6</math> células)</b>		
Jóvenes	43±3	32±2
Septuagenarios	40±4	36±4
<b>- Estimulado (nmol/<math>10^6</math> células)</b>		
Jóvenes	60±4	59±5
Septuagenarios	56±3	47±1
<b>- % Estimulación</b>		
Jóvenes	147±12	199±17
Septuagenarios	155±10	150±9

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.



**Figura 19.** Índice de adherencia (% neutrófilos adherentes) (A), índice de quimiotaxis (número de neutrófilos en filtro) (B), y niveles de anión superóxido intracelular (nmol/ $10^6$  neutrófilos) en condiciones basales (C) y estimuladas (D), y el porcentaje de estimulación (%) en los niveles de anión superóxido (E), en neutrófilos de sangre periférica de jóvenes (20-29 años) y septuagenarios (70-79 años), a las 10:00h y a las 15:00h. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido a las 10:00h. ### $P \leq 0,001$ , # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor en jóvenes.

#### 4.2.1.2. Cambios en las funciones de linfocitos: Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK

Los resultados obtenidos en relación a las funciones estudiadas en linfocitos se muestran en la tabla XIV y en la figura 20.

Los índices de **adherencia** (Fig. 20A) aumentaron ( $P \leq 0,05$ ) a las 15:00h en relación a las 10:00h en los septuagenarios. Al comparar los valores entre jóvenes y septuagenarios, la adherencia fue mayor ( $P \leq 0,01$ ) en los segundos a las 15:00h. En los índices de **quimiotaxis** (Fig. 20B) se observó una disminución, tanto en jóvenes ( $P \leq 0,05$ ) como en septuagenarios ( $P \leq 0,01$ ), a las 15:00h con respecto a las 10:00h. Los septuagenarios presentaron unos

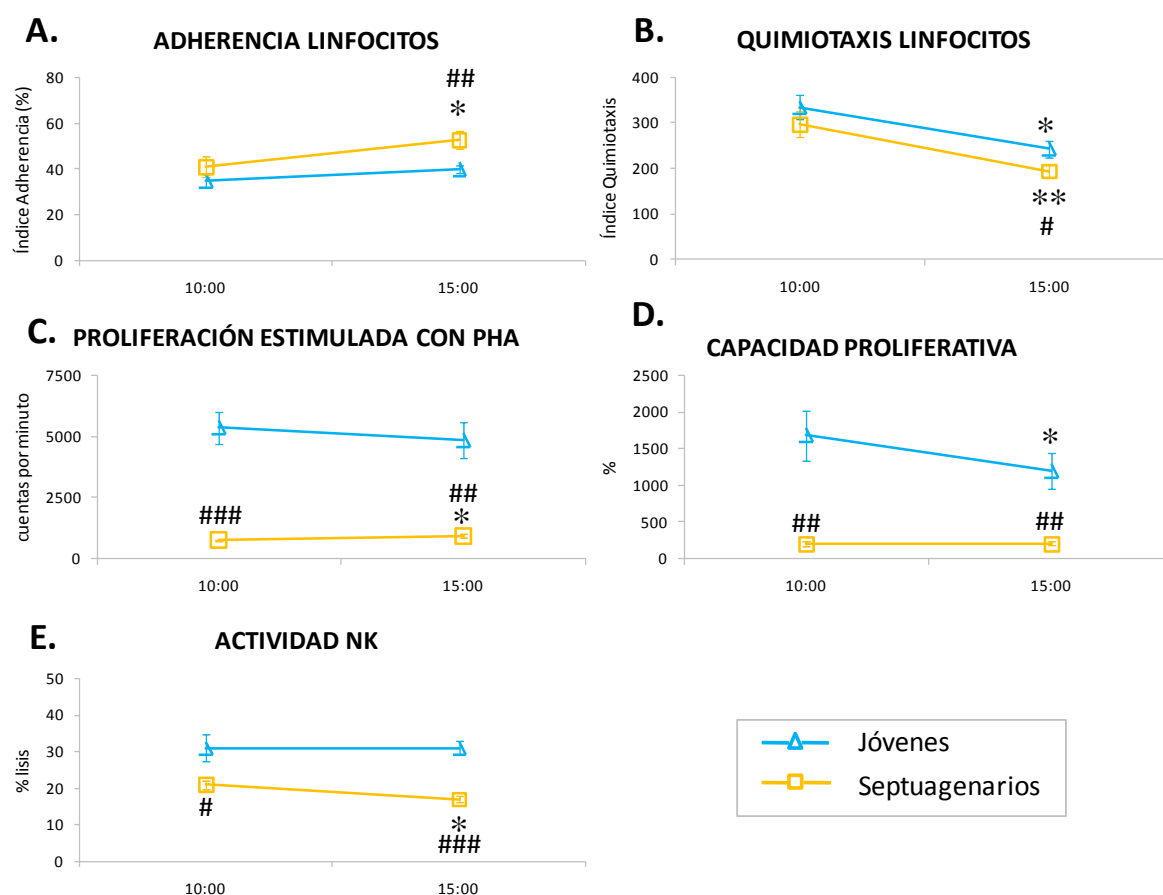
valores menores ( $P \leq 0,05$ ) que los jóvenes a las 15:00h. No se apreciaron cambios significativos en la **proliferación basal** entre las 10:00h y las 15:00h en ninguno de los dos grupos de edad, si bien los septuagenarios mostraron niveles mayores que los jóvenes a las 10:00h ( $P \leq 0,05$ ) y a las 15:00h ( $P \leq 0,01$ ). La proliferación **estimulada con PHA** apareció aumentada ( $P \leq 0,05$ ) en los septuagenarios a las 15:00h en comparación con las 10:00h (Fig. 20C). Los niveles fueron menores en los septuagenarios que en los jóvenes, tanto a las 10:00h ( $P \leq 0,001$ ) como a las 15:00h ( $P \leq 0,01$ ). En la **capacidad de estimulación proliferativa** de los linfocitos (Fig. 20D), parámetro que relaciona la proliferación basal, a la que se le da el valor 100, y la estimulada con PHA, se observó una disminución ( $P \leq 0,05$ ) de sus valores en los jóvenes a las 15:00h en relación a las 10:00h. En ambas horas estudiadas, la capacidad proliferativa apareció disminuida ( $P \leq 0,01$ ) en los septuagenarios en comparación con los jóvenes.

**Tabla XIV.** Índice de adherencia (% linfocitos adherentes), índice de quimiotaxis (número de linfocitos en filtro), proliferación (cuentas por minuto) basal y estimulada con fitohemaglutinina (PHA), la capacidad de estimulación proliferativa (%), y la actividad *Natural Killer* (% lisis de células tumorales) de linfocitos de sangre periférica de jóvenes (20-29 años) y septuagenarios (70-79 años) en dos horas distintas del día, a las 10:00h y a las 15:00h.

Función Linfocitos	10:00h	15:00h
<b>Índice de adherencia (%)</b>		
Jóvenes	35±3	40±2
Septuagenarios	41±5	53±4
<b>Índice de quimiotaxis (nº linfocitos)</b>		
Jóvenes	335±26	243±18
Septuagenarios	297±27	194±14
<b>Proliferación</b>		
- Basal (cuentas por minuto)		
Jóvenes	318±29	324±17
Septuagenarios	447±40	476±36
- En respuesta a PHA (cuentas por minuto)		
Jóvenes	5362±640	4850±713
Septuagenarios	764±37	957±60
- Capacidad de estimulación proliferativa (%)		
Jóvenes	1687±340	1203±242
Septuagenarios	208±38	208±26
<b>Actividad <i>Natural Killer</i> (% lisis)</b>		
Jóvenes	31±4	31±2
Septuagenarios	21±1	17±1

Los resultados son la media ± el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado.

En cuanto a la **actividad NK** (Fig. 20E), en los septuagenarios se apreció una disminución ( $P \leq 0,05$ ) a las 15:00h con respecto a las 10:00h. Los septuagenarios mostraron unos niveles menores que los jóvenes, tanto a las 10:00h ( $P \leq 0,05$ ) como a las 15:00h ( $P \leq 0,001$ ).



**Figura 20.** Índice de adherencia (% linfocitos adherentes) (A), índice de quimiotaxis (número de linfocitos en filtro) (B), proliferación en respuesta a PHA (cuentas por minuto) (C), la capacidad de estimulación proliferativa (%) (D) y la actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis de células tumorales) (E), de linfocitos de sangre periférica de jóvenes (20-29 años) y septuagenarios (70-79 años), a las 10:00h y a las 15:00h. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado.  $**P \leq 0,01$ ,  $*P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido a las 10:00h.  $###P \leq 0,001$ ,  $##P \leq 0,01$ ,  $#P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor en jóvenes.

#### 4.2.2. Cambios en la funcionalidad de leucocitos de sangre periférica a lo largo de las distintas estaciones del año

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en relación a la funcionalidad de las células inmunológicas en las distintas estaciones del año, primavera, verano, otoño e invierno, de mujeres y hombres incluidos en dos grupos de edades, adultos (30-49 años) y maduros (60-79 años).

##### 4.2.2.1. Cambios en las funciones de neutrófilos: Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares

Los resultados relativos a los cambios que se observan en las funciones estudiadas en neutrófilos, se muestran en la tabla XV y en la figura 21.

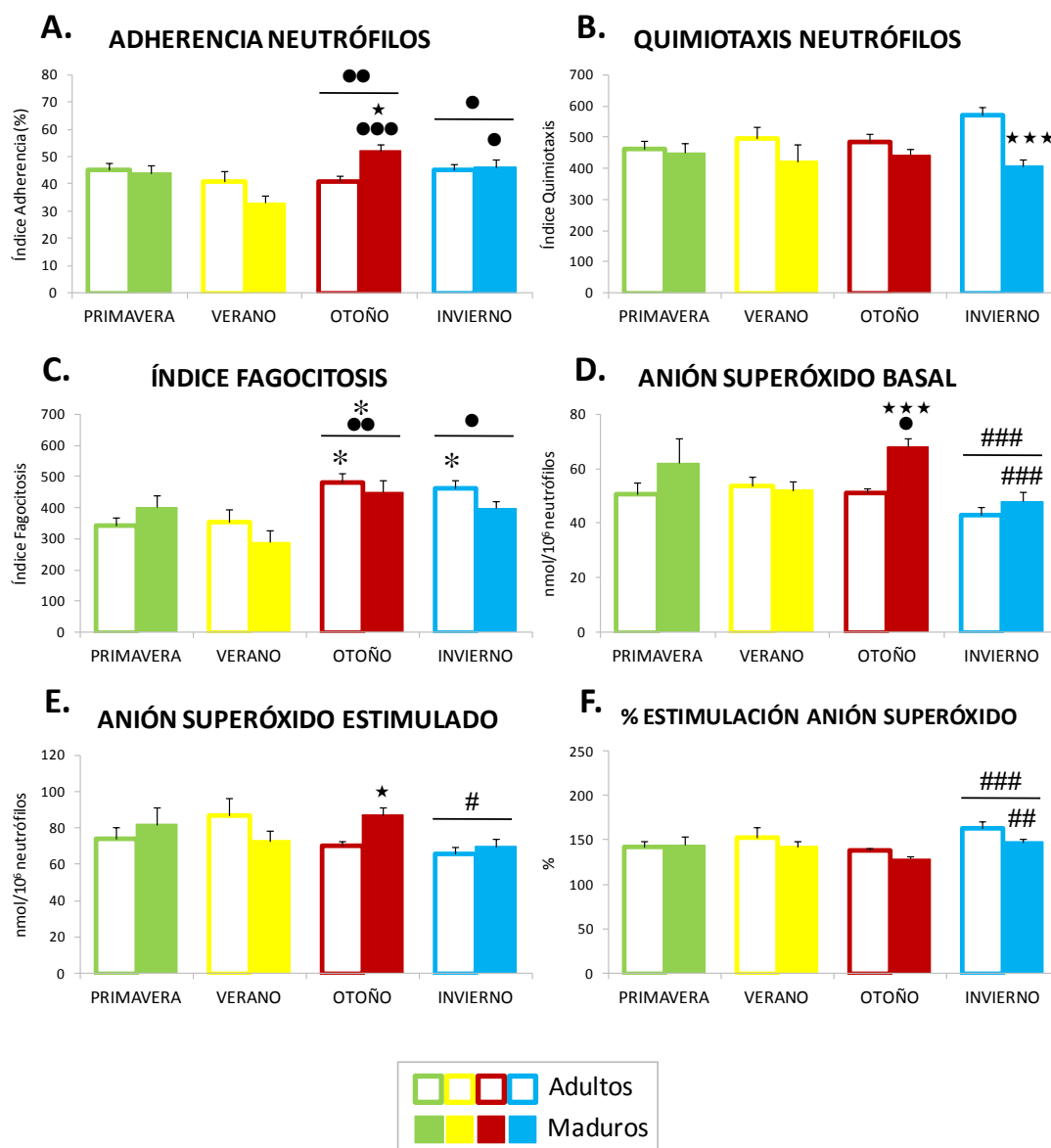
Respecto a los índices de **adherencia** y considerando la población total se apreció un aumento de los mismos en otoño ( $P \leq 0,01$ ) e invierno ( $P \leq 0,05$ ) con respecto al verano (Fig. 21A). Estos incrementos fueron debidos principalmente a los que experimentó el grupo de maduros en dichas estaciones ( $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,05$ , respectivamente). Además, comparando en cada estación los dos grupos de edades, los maduros mostraron una mayor ( $P \leq 0,05$ ) adherencia que los adultos en otoño. Los índices de **quimiotaxis** (Fig. 21B) se encontraron de manera general (sin tener en cuenta la estacionalidad) disminuidos ( $P \leq 0,001$ ) en los maduros ( $IQ=430 \pm 15$ ) con respecto a los adultos ( $IQ=502 \pm 15$ ), y concretamente, de manera altamente significativa ( $P \leq 0,001$ ) en invierno. En cuanto al índice de fagocitosis (Fig. 21C), se observó un efecto de la estacionalidad altamente significativa ( $P \leq 0,001$ ). Los valores aparecieron aumentados de manera general en otoño en relación a primavera ( $P \leq 0,05$ ) y verano ( $P \leq 0,01$ ), y en invierno en comparación con verano ( $P \leq 0,05$ ). Cabe destacar que dichos aumentos se debieron principalmente a los altos valores que presentaron los adultos en ambas estaciones (otoño e invierno) con respecto a los valores obtenidos en el mismo grupo de edad en primavera ( $P \leq 0,05$ ). En la eficacia de fagocitosis, no se encontró efecto alguno de la estacionalidad, si bien tuvo lugar un fuerte efecto del factor edad, con una disminución ( $P \leq 0,001$ ) de esta función en maduros ( $EF=52 \pm 2$  %) en relación a adultos ( $EF=64 \pm 2$  %). Respecto a los niveles intracelulares de anión superóxido en condiciones basales (Fig. 21D), los mismos fueron, en general, significativamente mayores ( $P \leq 0,01$ ) en

maduros ( $57 \pm 2$  nmol/ $10^6$  neutrófilos) en comparación con adultos ( $50 \pm 2$  nmol/ $10^6$  neutrófilos). Además, se apreció un fuerte efecto ( $P \leq 0,01$ ) de la estacionalidad, disminuyendo significativamente ( $P \leq 0,001$ ) los valores en invierno con respecto a otoño. Al analizar los factores edad y estacionalidad conjuntamente, los niveles basales de anión superóxido aumentaron en los maduros en otoño en relación a los adultos durante la misma estación ( $P \leq 0,001$ ), y en relación a los maduros en verano ( $P \leq 0,05$ ). Además, se observó una disminución ( $P \leq 0,001$ ) en los maduros en invierno en comparación con los valores en otoño de la misma edad. En cuanto a los niveles de anión superóxido en condiciones estimuladas (Fig. 21E), los valores presentaron una disminución ( $P \leq 0,05$ ) en la población total en invierno con respecto a otoño. Los maduros en otoño mostraron unos valores mayores ( $P \leq 0,05$ ) que los adultos durante la misma estación. Finalmente, el porcentaje de estimulación de anión superóxido intracelular (Fig. 21F), parámetro obtenido de la relación entre los niveles en condiciones basales, a la que se les da el valor 100, y estimuladas, se encontró un fuerte efecto ( $P \leq 0,01$ ) de la estacionalidad, siendo significativamente mayor ( $P \leq 0,001$ ) en invierno en relación a otoño, y especialmente en los maduros entre dichas estaciones ( $P \leq 0,01$ ).

**Tabla XV.** Índice de adherencia (% neutrófilos adherentes), índice de quimiotaxis (número de neutrófilos en filtro), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 neutrófilos), eficacia de fagocitosis (número de neutrófilos que han fagocitado/100 neutrófilos) y niveles de anión superóxido intracelular (nmol/10<sup>6</sup> neutrófilos) en condiciones basales y estimuladas, y el porcentaje de estimulación (%) en los niveles de anión superóxido, de neutrófilos de sangre periférica de personas de diferentes edades (población total), de adultos (30-49 años) y de maduros (60-79 años), en las distintas estaciones del año.

Función neutrófilos	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
<b>Índice de adherencia (%)</b>				
Población Total	44±2	37±2	46±2	46±2
Adultos	45±3	41±4	41±2	45±2
Maduros	44±3	33±3	52±3	46±3
<b>Índice de quimiotaxis (nº neutrófilos)</b>				
Población Total	455±20	458±25	464±19	488±20
Adultos	461±25	495±38	484±28	569±28
Maduros	449±31	421±56	443±20	407±20
<b>Índice de fagocitosis (nº bolas látex)</b>				
Población Total	372±23	322±28	465±21	429±21
Adultos	343±25	353±40	481±30	460±26
Maduros	402±36	290±38	449±39	398±22
<b>Eficacia de fagocitosis (%)</b>				
Población Total	59±3	52±3	58±3	61±3
Adultos	66±3	59±4	65±3	64±3
Maduros	52±5	45±5	51±4	58±3
<b>Niveles de anión superóxido intracelular</b>				
<b>- No estimulado (nmol/10<sup>6</sup> células)</b>				
Población Total	56±3	53±4	60±3	46±3
Adultos	51±5	54±4	51±2	43±3
Maduros	62±9	52±4	68±3	48±3
<b>- Estimulado (nmol/10<sup>6</sup> células)</b>				
Población Total	78±4	80±5	79±4	68±4
Adultos	74±7	87±9	70±3	66±3
Maduros	82±10	73±5	87±5	70±5
<b>- % Estimulación</b>				
Población Total	144±5	148±6	134±5	155±5
Adultos	142±7	153±12	138±3	163±9
Maduros	145±9	143±6	129±3	148±4

Los resultados son la media ± el error estándar de 15-31 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.



**Figura 21.** Índice de adherencia (% neutrófilos adherentes) (A), índice de quimiotaxis (número de neutrófilos en filtro) (B), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 neutrófilos) (C), y niveles de anión superóxido intracelular (nmol/ $10^6$  neutrófilos) en condiciones basales (D) y estimuladas (E), y el porcentaje de estimulación (%) en los niveles de anión superóxido (F), de neutrófilos de sangre periférica de personas adultas (30-49 años) y maduras (60-79 años), en las distintas estaciones del año. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 15-31 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en primavera. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en verano. ### $P \leq 0,001$ , ## $P \leq 0,01$ , # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en otoño. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor en adultos de la misma estación.



#### 4.2.2.2. Cambios en las funciones de linfocitos: Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK

Los resultados relativos a los cambios que se observan en la funcionalidad estudiada en linfocitos se muestran en la tabla XVI y en la figura 22.

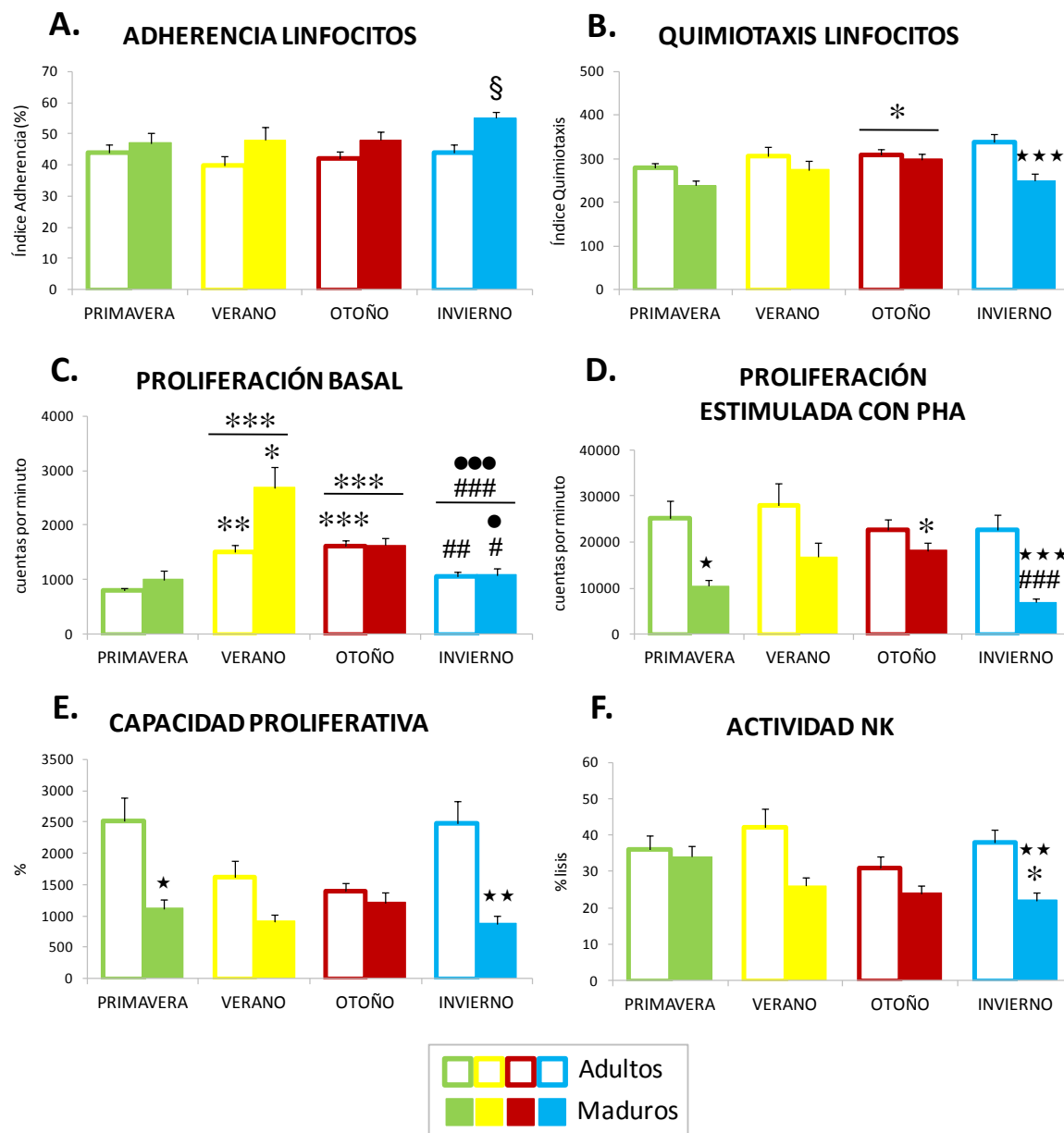
**Tabla XVI.** Índice de adherencia (% linfocitos adherentes), índice de quimiotaxis (número de linfocitos en filtro), proliferación (cuentas por minuto) basal y estimulada con fitohemaglutinina (PHA), la capacidad de estimulación proliferativa (%), y la actividad *Natural Killer* (% lisis de células tumorales) de linfocitos de sangre periférica de personas de diferentes edades (población total), adultas (30-49 años) y maduras (60-79 años), en las distintas estaciones del año.

Función linfocitos	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
<b>Índice de adherencia (%)</b>				
Población Total	45±2	44±2	45±2	49±2
Adultos	44±3	40±3	42±2	44±3
Maduros	47±3	48±4	48±3	55±2
<b>Índice de quimiotaxis (nº linfocitos)</b>				
Población Total	258±11	290±13	304±10	293±11
Adultos	278±11	306±22	309±13	337±19
Maduros	239±12	274±20	298±13	249±16
<b>Proliferación</b>				
<b>- Basal (cuentas por minuto)</b>				
Población Total	898±105	2092±119	1621±91	1072±91
Adultos	795±63	1499±148	1608±106	1055±87
Maduros	1001±159	2685±388	1634±130	1090±113
<b>- En respuesta a PHA (cuentas por minuto)</b>				
Población Total	17820±2139	22365±2409	20396±1836	14893±1836
Adultos	25164±3828	27904±4778	22601±2322	22795±3090
Maduros	10476±1378	16826±3167	18192±1673	6990±669
<b>- Capacidad de estimulación proliferativa (%)</b>				
Población Total	1818±188	1262±212	1309±161	1673±161
Adultos	2520±359	1614±269	1402±127	2468±354
Maduros	1116±141	911±111	1216±169	877±126
<b>Actividad <i>Natural Killer</i> (% lisis)</b>				
Población Total	35±2	34±3	27±2	30±2
Adultos	36±4	42±5	31±3	38±3
Maduros	34±3	26±2	24±2	22±2

Los resultados son la media ± el error estándar de 15-31 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado.

La edad ejerció un fuerte efecto sobre los índices de **adherencia** (Fig. 22A), mostrando unos valores mayores ( $P \leq 0,001$ ) en los maduros ( $IA=50 \pm 2$ ) que en los adultos ( $IA=42 \pm 1$ ). Al analizar los factores edad y estacionalidad conjuntamente, se observó una tendencia hacia unos índices mayores ( $P=0,067$ ) en los maduros en comparación con los adultos en invierno. Respecto a los índices de **quimiotaxis**, los sujetos maduros, en general ( $IQ=265 \pm 8$ ), presentaron unos niveles menores ( $P \leq 0,001$ ) que los adultos ( $IQ=307 \pm 8$ ). Además, se apreció un efecto significativo ( $P \leq 0,05$ ) de la estacionalidad, mostrando mayores ( $P \leq 0,05$ ) índices en otoño que en primavera (Fig. 22B). Al comparar los valores entre maduros y adultos de una misma estación, en los primeros tuvo lugar una disminución altamente significativa ( $P \leq 0,001$ ) en invierno. En cuanto a la **proliferación basal** (Fig. 22C), se observó un fuerte efecto tanto de la edad, siendo mayor ( $P \leq 0,001$ ) en los maduros ( $1602 \pm 76$  cpm) que en los adultos ( $1239 \pm 68$  cpm), como de la estacionalidad ( $P \leq 0,001$ ). En verano y en otoño se encontraron unos niveles mayores ( $P \leq 0,001$ ) que en primavera, y en invierno unos niveles menores ( $P \leq 0,001$ ) que en verano y en otoño. El aumento de la proliferación basal en verano con respecto a primavera apareció tanto en los adultos ( $P \leq 0,01$ ) como en los maduros ( $P \leq 0,05$ ); sin embargo el aumento en otoño en relación a primavera sólo ocurrió significativamente ( $P \leq 0,001$ ) en adultos. Además, la disminución de los niveles en invierno en comparación con otoño se presentaron tanto en los adultos ( $P \leq 0,01$ ) como en los maduros ( $P \leq 0,05$ ), y sólo en maduros ( $P \leq 0,05$ ) en comparación con verano. La proliferación **en respuesta a PHA** mostró un fuerte efecto de la edad, con una clara disminución ( $P \leq 0,001$ ) en los maduros ( $13121 \pm 1545$  cpm) con respecto a los adultos ( $24616 \pm 1376$  cpm). El factor estacionalidad ejerció únicamente una tendencia ( $P=0,058$ ) a los cambios. En maduros los valores aumentaron ( $P \leq 0,05$ ) en otoño con respecto a primavera, y disminuyeron ( $P \leq 0,001$ ) en invierno con respecto a otoño en el mismo grupo de edad (Fig. 22D). Además, los maduros mostraron unos niveles menores que los adultos en primavera ( $P \leq 0,05$ ) y en invierno ( $P \leq 0,001$ ). En relación a la **capacidad de estimulación proliferativa** (Fig. 22E), parámetro que relaciona la proliferación basal, a la que se le da el valor 100, y la estimulada con PHA, se encontró un fuerte efecto de la edad, con menores valores ( $P \leq 0,001$ ) en maduros ( $1030 \pm 136$  %) que en adultos ( $2001 \pm 121$  %). Estas diferencias fueron especialmente significativas en primavera ( $P \leq 0,05$ ) y en invierno ( $P \leq 0,01$ ). En relación al % de lisis de la **actividad NK**, los maduros, en general, mostraron unos niveles menores ( $P \leq 0,001$ ) que los adultos ( $26 \pm 2$  % y  $37 \pm 2$  %, respectivamente), especialmente en invierno ( $P \leq 0,01$ )

(Fig. 22F). Además los maduros presentaron unos niveles menores ( $P \leq 0,05$ ) que en primavera.



**Figura 22.** Índice de adherencia (% linfocitos adherentes) (A), índice de quimiotaxis (número de linfocitos en filtro) (B), proliferación (cuentas por minuto) basal (C) y en respuesta a fitohemaglutinina (PHA) (D), la capacidad de estimulación proliferativa (%) (E) y la actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis de células tumorales) (F), de linfocitos de sangre periférica de adultos (30-49 años) y maduros (60-79 años), a lo largo de las distintas estaciones del año. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 15-31 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en primavera. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en verano. \*\*\*\* $P \leq 0,001$ , ### $P \leq 0,01$ , # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en otoño. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor en adultos de la misma estación. § $P = 0,067$  con respecto a los adultos de la misma estación.

### 4.3. ENVEJECIMIENTO SALUDABLE: ESTUDIO DE UNA POBLACIÓN NONAGENARIA. CAMBIOS CON LA EDAD EN LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EN PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y DE DEFENSA ANTIOXIDANTE EN PLASMA

En este tercer apartado, se muestran los resultados obtenidos en relación a diversos parámetros de función del sistema inmunitario, incluyendo niveles de citoquinas en distintas muestras biológicas, de inflamación y de defensa antioxidante de un grupo compuesto por hombres y mujeres nonagenarios (90-99 años), así como de adultos (30-49 años) y maduros (60-79 años). Para la valoración de las citoquinas, la edad del grupo de maduros fue reducida a septuagenarios (70-79 años).

#### 4.3.1. Cambios con la edad en las funciones de neutrófilos: Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares

Los resultados obtenidos en relación a las funciones estudiadas en neutrófilos se muestran en la tabla XVII y en la figura 23.

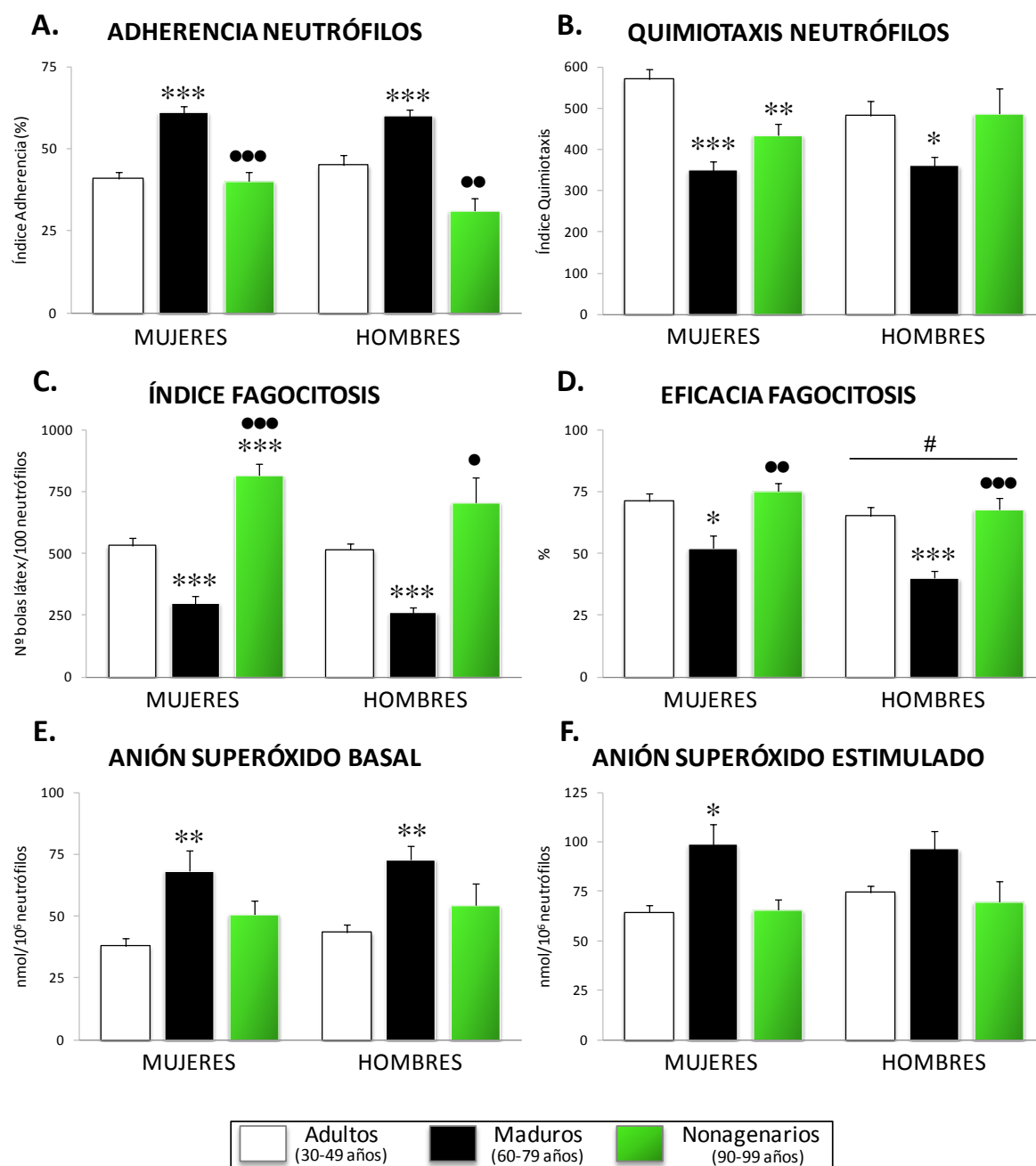
El factor edad ejerció un efecto altamente significativo ( $P \leq 0,001$ ) sobre los índices de **adherencia** de neutrófilos, ya que los niveles fueron mayores ( $P \leq 0,001$ ) en el grupo de los maduros en relación a los adultos y los nonagenarios. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre mujeres (IA=47±1) y hombres (IA=45±2) de la población total. Al analizar ambos factores conjuntamente, tanto las mujeres como los hombres maduros mostraron unos índices mayores ( $P \leq 0,001$ ) que los adultos (Fig. 23A). Los valores disminuyeron en los nonagenarios con respecto a los maduros en ambos sexos ( $P \leq 0,001$  en mujeres y  $P \leq 0,01$  en hombres). En los índices de **quimiotaxis** no se apreciaron diferencias debidas al género (IQ=452±15 en mujeres y IQ=443±20 en hombres), pero sí debidas a la edad ( $P \leq 0,001$ ). En la edad madura se observaron unos niveles menores que en la adulta ( $P \leq 0,001$ ) y nonagenaria ( $P \leq 0,01$ ), y estos últimos presentaron una tendencia ( $P=0,061$ ) hacia unos niveles menores que los adultos. Cabe destacar que los factores género y edad mostraron una interacción entre sí de valor  $P=0,055$ . Así, mientras que en las mujeres tuvo lugar una disminución de los niveles de quimiotaxis tanto en la edad madura ( $P \leq 0,001$ ) como en la nonagenaria ( $P \leq 0,01$ ) en comparación con la adulta (Fig. 23B), sólo en los hombres maduros se observó dicha disminución ( $P \leq 0,05$ ). En los índices de fagocitosis se apreció una

tendencia ( $P=0,093$ ) hacia unos valores menores en los hombres ( $IF=493\pm25$ ) en relación a las mujeres ( $IF=548\pm20$ ). El factor edad ejerció una fuerte influencia ( $P\leq0,001$ ) sobre los índices. Los tres grupos de edades mostraron unas diferencias altamente significativas ( $P\leq0,001$ ) entre sí, siendo los nonagenarios los que aparecieron con los mayores valores, y los maduros los menores. En la figura 23C se observa que tanto las mujeres como los hombres maduros presentaron una disminución ( $P\leq0,001$ ) con respecto a sus respectivos adultos. En las nonagenarias los valores resultaron ser mayores ( $P\leq0,001$ ) que en las adultas y las maduras. En los hombres nonagenarios sólo se observaron diferencias en dichos índices con los maduros ( $P\leq0,05$ ), siendo en aquellos mayores que en estos últimos. Los valores de la eficacia de fagocitosis (Fig. 23D) fueron menores ( $P\leq0,05$ ) en hombres ( $EF=58\pm3$ ) que en mujeres ( $EF=66\pm2$ ). El factor edad influyó de manera altamente significativa ( $P\leq0,001$ ) sobre dicha función. En los maduros tuvo lugar una disminución de sus valores ( $P\leq0,001$ ) en relación a los adultos y los nonagenarios. Al analizar ambos factores conjuntamente, los maduros mostraron unos niveles menores que los adultos, en mujeres ( $P\leq0,05$ ) y en hombres ( $P\leq0,001$ ), y los nonagenarios unos niveles mayores que los maduros ( $P\leq0,01$  en mujeres y  $P\leq0,001$  en hombres). En el contenido intracelular de anión superóxido en condiciones basales, no se encontraron diferencias significativas entre mujeres ( $52\pm3$  nmol/ $10^6$  neutrófilos) y hombres ( $57\pm4$  nmol/ $10^6$  neutrófilos). El factor edad incidió significativamente ( $P\leq0,001$ ) sobre sus niveles: en la edad madura se apreció un aumento en comparación con la adulta ( $P\leq0,001$ ) y la nonagenaria ( $P\leq0,01$ ). Dicho aumento se observó tanto en mujeres como en hombres ( $P\leq0,01$ ), pero sólo en relación a los adultos (Fig. 23E). En condiciones estimuladas, únicamente el factor edad ejerció un efecto significativo ( $P\leq0,001$ ) sobre los niveles de anión superóxido, ya que las mujeres y los hombres presentaron valores similares ( $76\pm4$  nmol/ $10^6$  neutrófilos en mujeres y  $80\pm5$  nmol/ $10^6$  neutrófilos en hombres). Los niveles aumentaron ( $P\leq0,001$ ) en maduros con respecto a adultos y nonagenarios. Sólo en mujeres maduras tuvo lugar dicho aumento (Fig. 23F), significativamente ( $P\leq0,05$ ) en comparación con las adultas, y una tendencia hacia niveles mayores ( $P=0,071$ ) en relación a las nonagenarias. En el porcentaje de estimulación de anión superóxido intracelular, parámetro obtenido de la relación entre los niveles en condiciones basales, a la que se le da el valor 100, y estimuladas, los factores edad y género no influyeron sobre sus niveles, por lo que no se apreciaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

**Tabla XVII.** Índice de adherencia (% neutrófilos adherentes), índice de quimiotaxis (número de neutrófilos en filtro), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 neutrófilos), eficacia de fagocitosis (número de neutrófilos que han fagocitado/100 neutrófilos) y niveles de anión superóxido intracelular (nmol/10<sup>6</sup> neutrófilos) en condiciones basales y estimuladas, y el porcentaje de estimulación (%) en los niveles de anión superóxido, de neutrófilos de sangre periférica de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), maduros (60-79 años) y nonagenarios (90-99 años).

Función neutrófilos	30-49 años	60-79 años	90-99 años
<b>Índice de adherencia (%)</b>			
Población Total	<b>43±2</b>	<b>60±2</b>	<b>36±3</b>
Mujeres	41±2	61±2	40±3
Hombres	45±3	60±2	31±4
<b>Índice de quimiotaxis (nº neutrófilos)</b>			
Población Total	<b>526±19</b>	<b>355±19</b>	<b>461±26</b>
Mujeres	571±25	349±21	435±26
Hombres	482±34	361±20	486±63
<b>Índice de fagocitosis (nº bolas látex)</b>			
Población Total	<b>523±24</b>	<b>279±24</b>	<b>759±34</b>
Mujeres	531±30	297±30	815±46
Hombres	515±26	260±23	704±104
<b>Eficacia de fagocitosis (%)</b>			
Población Total	<b>68±3</b>	<b>46±3</b>	<b>72±4</b>
Mujeres	71±3	52±5	75±3
Hombres	65±4	40±3	68±5
<b>Niveles de anión superóxido intracelular</b>			
<b>- No estimulado (nmol/10<sup>6</sup> células)</b>			
Población Total	<b>41±4</b>	<b>71±4</b>	<b>53±5</b>
Mujeres	38±3	68±8	51±5
Hombres	43±3	73±6	55±9
<b>- Estimulado (nmol/10<sup>6</sup> células)</b>			
Población Total	<b>70±5</b>	<b>98±5</b>	<b>68±7</b>
Mujeres	65±4	99±10	66±5
Hombres	75±3	96±9	70±10
<b>- % Estimulación</b>			
Población Total	<b>200±15</b>	<b>167±15</b>	<b>148±21</b>
Mujeres	208±22	183±32	166±22
Hombres	193±15	150±18	130±4

Los resultados son la media ± el error estándar de 9-26 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.



**Figura 23.** Índice de adherencia (% neutrófilos adherentes) (A), índice de quimiotaxis (número de neutrófilos en filtro) (B), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 neutrófilos) (C), eficacia de fagocitosis (número de neutrófilos que han fagocitado/100 neutrófilos) (D) y niveles de anión superóxido intracelular (nmol/ $10^6$  neutrófilos) en condiciones basales (E) y estimuladas (F), de neutrófilos de sangre periférica de adultos (30-49 años), maduros (60-79 años) y nonagenarios (90-99 años), tanto mujeres como hombres. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 9-26 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en maduros. # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.3.2. Cambios con la edad en las funciones de linfocitos: Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK

Los resultados obtenidos en relación a las funciones analizadas en linfocitos se muestran en la tabla XVIII y en la figura 24.

Los índices de **adherencia** de linfocitos no mostraron diferencias entre mujeres ( $IA=47\pm2$ ) y hombres ( $IA=47\pm2$ ), pero sí con la edad ( $P\leq0,001$ ). En los maduros tuvo lugar un aumento ( $P\leq0,001$ ) de sus valores con respecto a los adultos y los nonagenarios. Al analizar los factores edad y género conjuntamente, tanto en las mujeres como en los hombres maduros se observaron unos valores mayores ( $P\leq0,001$ ) en relación a los adultos (Fig. 24A). Al comparar los nonagenarios y los maduros, en los primeros se apreciaron valores menores ( $P\leq0,05$ ) en hombres, mientras que las mujeres presentaron una tendencia ( $P=0,071$ ) en dicha diferencia. Los índices de **quimiotaxis** disminuyeron ( $P\leq0,001$ ) en los maduros en comparación con los adultos, mientras que aumentaron en los nonagenarios con respecto a los adultos ( $P\leq0,01$ ) y los maduros ( $P\leq0,001$ ). Se observó una interacción significativa ( $P\leq0,05$ ) entre ambos factores. Al comparar la disminución de la edad madura en relación a la adulta en cada sexo, en las mujeres resultó ser más significativo ( $P\leq0,001$ ) que en los hombres ( $P\leq0,05$ ) (Fig. 24B). Además, tanto en las mujeres como en los hombres nonagenarios los valores de la quimiotaxis aparecieron aumentados ( $P\leq0,001$  y  $P\leq0,01$ , respectivamente) en comparación con los maduros, y en el caso de los hombres, en comparación con los adultos ( $P\leq0,05$ ) también. En ausencia de estímulo, la **respuesta proliferativa** de los linfocitos fue menor ( $P\leq0,001$ ) en los nonagenarios en comparación con los adultos y los maduros, tanto en hombres ( $P\leq0,001$ ) como en mujeres ( $P\leq0,001$  y  $P\leq0,01$ , respectivamente), siendo el género un factor que no influyó sobre sus niveles. En la capacidad de estimulación proliferativa, parámetro que relaciona los niveles de proliferación en condiciones basales, a la que se les da el valor 100, y estimuladas con PHA, al omitir el factor edad, no se encontraron diferencias significativas entre mujeres ( $1276\pm102\%$ ) y hombres ( $1236\pm153\%$ ). El factor edad ejerció un efecto altamente significativo ( $P\leq0,001$ ) sobre sus niveles, ya que en la edad madura fueron menores ( $P\leq0,001$ ) que en la adulta, especialmente en las mujeres ( $P\leq0,01$ ) (Fig. 24C). Los nonagenarios de la población total mostraron una tendencia ( $P=0,092$ ) hacia unos niveles menores en relación a los adultos, tendencia que se perdió al analizar mujeres y hombres por separado. En cuanto a la

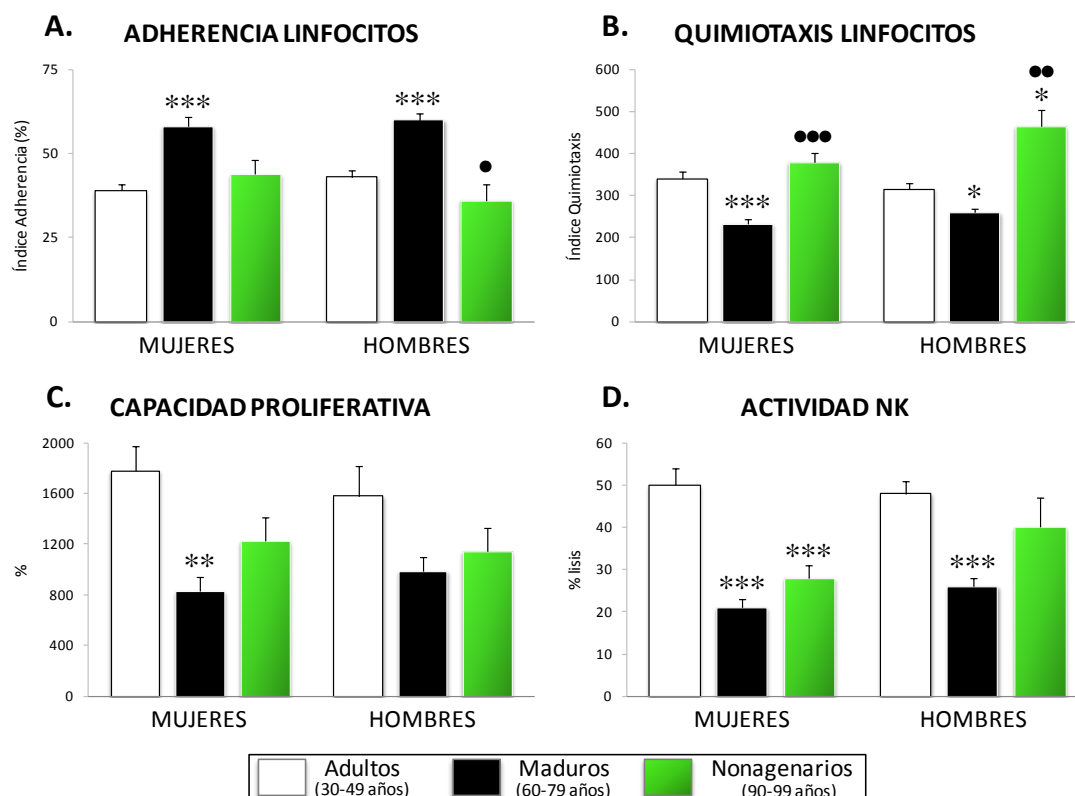


**actividad NK**, se apreció una alta influencia ( $P \leq 0,001$ ) del factor edad sobre sus niveles. Tanto los maduros como los nonagenarios presentaron una actividad menor ( $P \leq 0,001$ ) que los adultos, y los nonagenarios una tendencia ( $P = 0,082$ ) hacia una actividad mayor que los maduros. Al comparar mujeres y hombres, se observó una tendencia ( $P = 0,078$ ) hacia unos niveles menores en ellas ( $33 \pm 2\%$  y  $38 \pm 2\%$ , respectivamente). Este hecho fue debido, principalmente, a que tanto en las maduras como en las nonagenarias tuvo lugar una disminución altamente significativa ( $P \leq 0,001$ ) de su actividad con respecto a las adultas, mientras que en el caso de los hombres, los valores sólo disminuyeron ( $P \leq 0,001$ ) en los maduros (Fig. 24D).

**Tabla XVIII.** Índice de adherencia (% linfocitos adherentes), índice de quimiotaxis (número de linfocitos en filtro), proliferación basal (cuentas por minuto), la capacidad de estimulación proliferativa (%), y la actividad *Natural Killer* (% lisis de células tumorales) de linfocitos de sangre periférica de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), maduros (60-79 años) y nonagenarios (90-99 años).

<b>Función linfocitos</b>	<b>30-49 años</b>	<b>60-79 años</b>	<b>90-99 años</b>
<b>Índice de adherencia (%)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>41±2</b>	<b>59±2</b>	<b>40±3</b>
<b>Mujeres</b>	39±2	58±3	44±4
<b>Hombres</b>	43±2	60±2	36±5
<b>Índice de quimiotaxis (nº linfocitos)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>327±12</b>	<b>245±12</b>	<b>422±16</b>
<b>Mujeres</b>	340±17	232±13	379±23
<b>Hombres</b>	315±14	259±11	464±40
<b>Proliferación</b>			
<b>- Basal (cuentas por minuto)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>1428±107</b>	<b>1468±107</b>	<b>614±186</b>
<b>Mujeres</b>	1426±150	1396±145	648±61
<b>Hombres</b>	1429±129	1539±229	579±83
<b>- Capacidad de estimulación proliferativa (%)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>1677±123</b>	<b>906±123</b>	<b>1185±214</b>
<b>Mujeres</b>	1776±200	827±116	1226±186
<b>Hombres</b>	1578±239	986±113	1144±180
<b>Actividad <i>Natural Killer</i> (% lisis)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>49±2</b>	<b>24±2</b>	<b>34±3</b>
<b>Mujeres</b>	50±4	21±2	28±3
<b>Hombres</b>	48±3	26±2	40±7

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de 9-26 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado.



**Figura 24.** Índice de adherencia (% linfocitos adherentes) (A), índice de quimiotaxis (número de linfocitos en filtro) (B), capacidad de estimulación proliferativa (%) (C) y actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis de células tumorales) (D) de linfocitos de sangre periférica de adultos (30-49 años), maduros (60-79 años) y nonagenarios (90-99 años), tanto mujeres como hombres. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 9-26 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en maduros.

#### 4.3.3. Valoración de los niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10, en diversas muestras biológicas

Las valoraciones de las citoquinas se realizaron en distintas muestras biológicas, como son 1) el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en respuesta al mitógeno PHA, 2) el plasma procedente de sangre incubada en ausencia/presencia de LPS, y 3) el plasma, con el fin de comprobar posibles efectos distintos de la edad sobre sus niveles en las distintas muestras biológicas. Además, los grupos de edades analizados fueron adultos (30-49 años), septuagenarios (70-79 años) y nonagenarios (90-99 años), tanto mujeres como hombres.

#### 4.3.3.1. Sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PHA

Los resultados obtenidos en relación a los niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica o PBMCs en respuesta a PHA se muestran en la tabla XIX y en la figura 25.

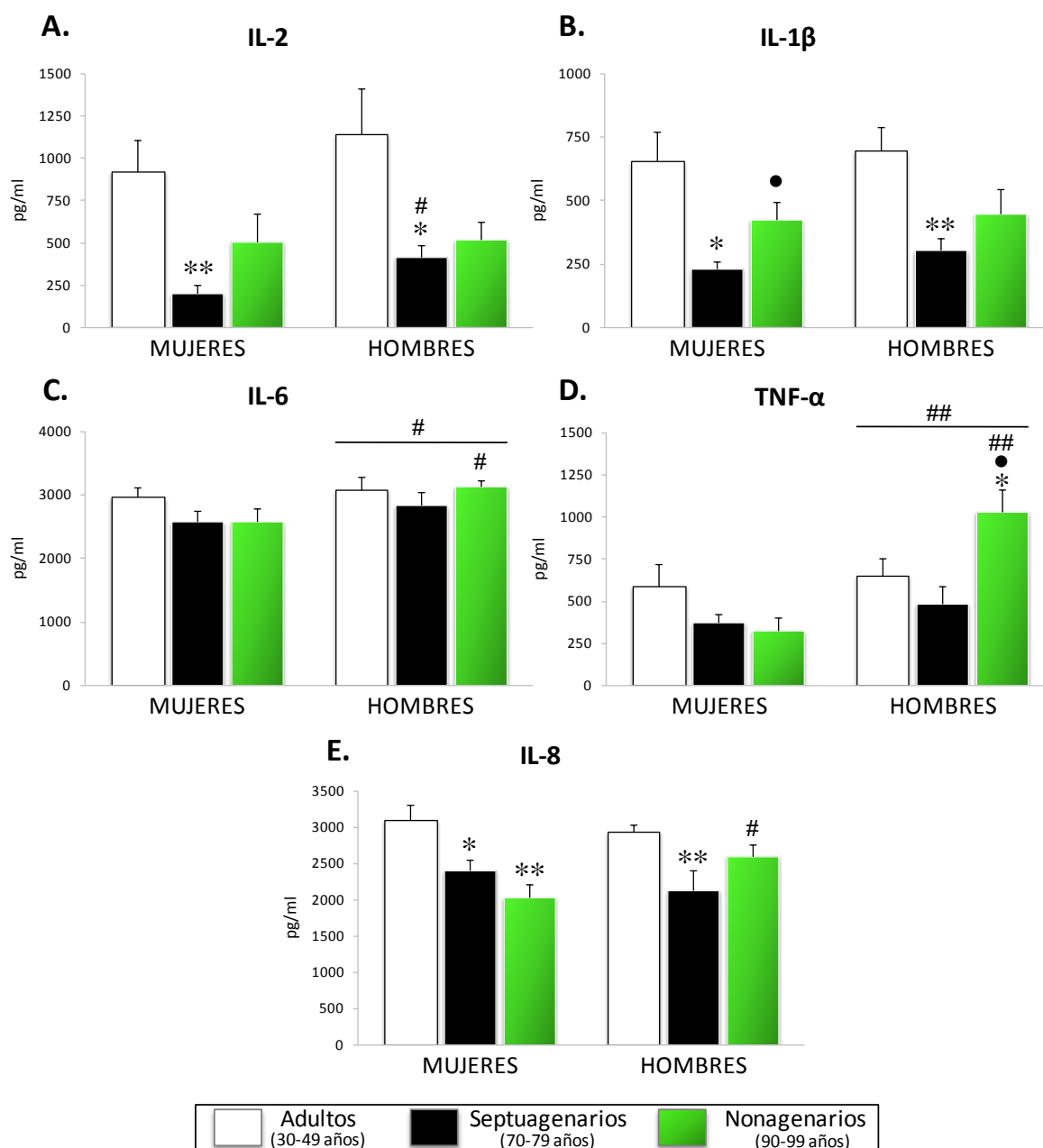
En los niveles de **IL-2**, no se encontraron diferencias significativas entre mujeres ( $582 \pm 114$  pg/ml) y hombres ( $731 \pm 133$  pg/ml) al omitir el factor edad, sin embargo en los septuagenarios, los hombres presentaron unos niveles mayores ( $P \leq 0,05$ ) que las mujeres (Fig. 25A). Con la edad, se observó una disminución altamente significativa ( $P \leq 0,001$ ) en los septuagenarios con respecto a los adultos. Dicha disminución fue mayor en mujeres ( $P \leq 0,01$ ) que en hombres ( $P \leq 0,05$ ). Al comparar los niveles entre nonagenarios y adultos, en aquellos aparecieron disminuidos ( $P \leq 0,05$ ), pudiendo ser observado sólo en los hombres en forma de tendencia ( $P = 0,066$ ). A su vez, en los nonagenarios de la población total se apreció una tendencia ( $P = 0,08$ ) hacia unos niveles mayores en relación a los septuagenarios, tendencia que se perdió al analizar mujeres y hombres por separado. Los niveles de **IL-1 $\beta$**  fueron prácticamente iguales en las mujeres y en los hombres ( $460 \pm 65$  pg/ml y  $505 \pm 61$  pg/ml, respectivamente). Con la edad (Fig. 25B), los septuagenarios mostraron una disminución ( $P \leq 0,001$ ) de sus niveles en comparación con los adultos, tanto en mujeres ( $P \leq 0,05$ ) como en hombres ( $P \leq 0,01$ ). Los niveles también disminuyeron ( $P \leq 0,05$ ) en los nonagenarios con respecto a los adultos, pero fueron mayores ( $P \leq 0,05$ ) que en los septuagenarios. Las diferencias significativas entre los nonagenarios y los adultos se perdieron al analizar a las mujeres y a los hombres por separado, y las mujeres nonagenarias presentaron unos niveles mayores ( $P \leq 0,05$ ) que las septuagenarias. En cuanto a **IL-6**, no se encontró una influencia significativa del factor edad sobre sus niveles, aunque sí una tendencia ( $P = 0,095$ ) hacia niveles menores en los septuagenarios con respecto a los adultos. Sin embargo, el factor género mostró una influencia significativa sobre los niveles de dicha citoquina, siendo mayores ( $P \leq 0,05$ ) en los hombres ( $3033 \pm 100$  pg/ml) que en las mujeres ( $2739 \pm 102$  pg/ml). Además, sus niveles aumentaron ( $P \leq 0,05$ ) en los hombres nonagenarios en relación a las mujeres de la misma edad (Fig. 25C). En los niveles de **TNF- $\alpha$**  (Fig. 25D) apareció una tendencia ( $P = 0,088$ ) hacia unos niveles menores en los septuagenarios al compararlos con los adultos. El factor género ejerció un efecto muy significativo sobre sus niveles,

observando unos valores mayores ( $P \leq 0,01$ ) en los hombres ( $729 \pm 83$  pg/ml) que en las mujeres ( $442 \pm 62$  pg/ml). En los hombres nonagenarios tuvo lugar un aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  con respecto a los hombres adultos ( $P \leq 0,05$ ), los hombres septuagenarios ( $P \leq 0,05$ ), y las mujeres nonagenarias ( $P \leq 0,01$ ). En cuanto a la quimioquina **IL-8** (Fig. 25E), en los septuagenarios se apreció una disminución altamente significativa ( $P \leq 0,001$ ) de sus niveles en relación a los adultos, siendo mayor dentro del grupo de los hombres ( $P \leq 0,01$ ) que en el de las mujeres ( $P \leq 0,05$ ). A su vez, los nonagenarios presentaron unos niveles menores ( $P \leq 0,001$ ) que los adultos, pero al analizar ambos sexos por separado, esta diferencia sólo fue significativa ( $P \leq 0,01$ ) en las mujeres. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre las mujeres y los hombres de la población total ( $2552 \pm 152$  y  $2598 \pm 121$  pg/ml, respectivamente), el análisis por edades mostró unos valores mayores ( $P \leq 0,05$ ) en hombres nonagenarios que en las mujeres de la misma edad. Finalmente, en la **IL-10**, la dilución 1:4 empleada para la valoración de las muestras no fue suficiente a la hora de determinar sus niveles, ya que la fluorescencia obtenida en ellas sobrepasaron a los de los puntos de la curva patrón proporcionado por el kit comercial. Todas las muestras pertenecientes a las mujeres adultas sobrepasaron los 8000 pg/ml, las septuagenarias también mostraron valores superiores a los 8000 pg/ml, pudiendo ser valorado en una mujer (5099 pg/ml), y en las nonagenarias en tres mujeres (3614pg/ml, 5082pg/ml y 5963 pg/ml). En cuanto a los hombres, sólo se pudo determinar los niveles de dicha citoquina en un adulto (7055 pg/ml) y un septuagenario (3761 pg/ml), el resto de individuos, junto con los hombres nonagenarios, mostraron niveles mayores de 8000 pg/ml.

**Tabla XIX.** Niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8 (pg/ml) en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), septuagenarios (70-79 años) y nonagenarios (90-99 años).

Citoquinas (sobrenadantes cultivo PHA)	30-49 años	70-79 años	90-99 años
<b>IL-2 (pg/ml)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>1029<math>\pm</math>161</b>	<b>309<math>\pm</math>54</b>	<b>511<math>\pm</math>95</b>
<b>Mujeres</b>	919 $\pm$ 189	203 $\pm$ 48	504 $\pm$ 169
<b>Hombres</b>	1138 $\pm$ 270	414 $\pm$ 71	519 $\pm$ 105
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/ml)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>674<math>\pm</math>73</b>	<b>270<math>\pm</math>26</b>	<b>436<math>\pm</math>57</b>
<b>Mujeres</b>	653 $\pm$ 119	233 $\pm$ 25	423 $\pm$ 69
<b>Hombres</b>	695 $\pm$ 94	307 $\pm$ 43	449 $\pm$ 97
<b>IL-6 (pg/ml)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>3027<math>\pm</math>120</b>	<b>2712<math>\pm</math>133</b>	<b>2867<math>\pm</math>130</b>
<b>Mujeres</b>	2973 $\pm$ 153	2590 $\pm$ 157	2592 $\pm$ 188
<b>Hombres</b>	3082 $\pm$ 195	2833 $\pm$ 217	3142 $\pm$ 93
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>620<math>\pm</math>81</b>	<b>427<math>\pm</math>59</b>	<b>678<math>\pm</math>128</b>
<b>Mujeres</b>	592 $\pm$ 130	372 $\pm$ 50	327 $\pm$ 73
<b>Hombres</b>	649 $\pm$ 106	482 $\pm$ 107	1028 $\pm$ 131
<b>IL-8 (pg/ml)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>3017<math>\pm</math>113</b>	<b>2271<math>\pm</math>150</b>	<b>2313<math>\pm</math>144</b>
<b>Mujeres</b>	3104 $\pm$ 208	2410 $\pm$ 135	2027 $\pm$ 178
<b>Hombres</b>	2930 $\pm$ 97	2132 $\pm$ 270	2599 $\pm$ 162

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de 7 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.



**Figura 25.** Niveles (pg/ml) de las citoquinas IL-2 (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), TNF- $\alpha$  (D) e IL-8 (E) en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) de adultos (30-49 años), septuagenarios (70-79 años) y nonagenarios (90-99 años), tanto mujeres como hombres. Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 7 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en septuagenarios. ## $P \leq 0,01$ , # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.3.3.2. Plasma procedente de sangre incubada previamente en ausencia/presencia de LPS

Los resultados obtenidos en relación a los niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 en el plasma procedente de sangre incubada previamente en ausencia/presencia de LPS, *plasma(-)LPS* y *plasma(+)LPS* respectivamente, se muestran en la tabla XX y en la figura 26. Además, en la tabla XXI y en la figura señalada previamente, se presenta la relación entre ambas muestras, es decir, la relación entre la liberación de citoquinas que se ha producido durante el proceso de incubación en ausencia de LPS (*plasma (-)LPS*), a la que se le ha dado el valor 1, y la que se ha liberado en presencia de LPS (*plasma (+)LPS*), expresada en ratios.

No se encontraron diferencias significativas entre mujeres y hombres al omitir el factor edad en ninguna de las citoquinas analizadas, ni en el *plasma (-)LPS* ni en el *plasma (+)LPS*: **IL-2**: 7,7 $\pm$ 1,1 pg/ml y 8,8 $\pm$ 1,3 pg/ml en el *plasma (-)LPS*, respectivamente; 4,6 $\pm$ 0,7 pg/ml y 5,2 $\pm$ 0,6 pg/ml en el *plasma (+)LPS*, respectivamente. **IL-1 $\beta$** : 17 $\pm$ 2 pg/ml y 24 $\pm$ 3 pg/ml en el *plasma (-)LPS*, respectivamente; 82 $\pm$ 16pg/ml y 100 $\pm$ 18pg/ml en el *plasma (+)LPS*, respectivamente. **IL-6**: 33 $\pm$ 5 pg/ml y 33 $\pm$ 5 pg/ml en el *plasma (-)LPS*, respectivamente; 3033 $\pm$ 751 pg/ml y 5482 $\pm$ 1324 pg/ml en el *plasma (+)LPS*, respectivamente. **TNF- $\alpha$** : 23 $\pm$ 3 pg/ml y 33 $\pm$ 5 pg/ml en el *plasma (-)LPS*, respectivamente; 1017 $\pm$ 238 pg/ml y 1471 $\pm$ 304 pg/ml en el *plasma (+)LPS*, respectivamente. **IL-8**: 66 $\pm$ 11 pg/ml y 45 $\pm$ 11 pg/ml en el *plasma (-)LPS*, respectivamente; 822 $\pm$ 147 pg/ml y 1344 $\pm$ 351 pg/ml en el *plasma (+)LPS*, respectivamente. **IL-10**: 30 $\pm$ 4 pg/ml y 29 $\pm$ 4 pg/ml en el *plasma (-)LPS*, respectivamente; 196 $\pm$ 44 pg/ml y 184 $\pm$ 52 pg/ml en el *plasma (+)LPS*, respectivamente.

Sin embargo, al analizar el ratio que relaciona ambos tipos de muestra, los hombres de la población total mostraron unos niveles menores ( $P\leq 0,05$ ) de **IL-10** (Fig. 26.C6) que las mujeres (ratio: 2,8 $\pm$ 0,3 y 4,9 $\pm$ 0,8, respectivamente), mientras que en el resto de las citoquinas no se encontraron diferencias entre mujeres y hombres (ratios: **IL-2**: 0,95 $\pm$ 0,17 y 1,29 $\pm$ 0,28, respectivamente; **IL-1 $\beta$** : 5,4 $\pm$ 1,1 y 4 $\pm$ 0,7, respectivamente; **IL-6**: 151 $\pm$ 28 y 221 $\pm$ 30, respectivamente; **TNF- $\alpha$** : 47 $\pm$ 8 y 55 $\pm$ 8, respectivamente; **IL-8**: 13,1 $\pm$ 1,6 y 16,7 $\pm$ 2,6, respectivamente).

Los niveles de **IL-2** en el *plasma (-)LPS* aumentaron en los septuagenarios con respecto a los adultos ( $P\leq 0,05$ ), y en los nonagenarios en relación a los adultos ( $P\leq 0,001$ ). Al analizar los factores edad y género conjuntamente, sólo se encontraron diferencias significativas en los

hombres con la edad: se observaron unos niveles mayores ( $P \leq 0,01$ ) en los hombres nonagenarios en comparación con los adultos (Fig. 26.A1), y los hombres septuagenarios presentaron una tendencia ( $P=0,057$ ) hacia unos niveles mayores con respecto a los adultos. En los niveles de IL-2 en el plasma (+)LPS, tanto los septuagenarios como los nonagenarios mostraron un aumento altamente significativo ( $P \leq 0,001$ ) en relación a los adultos. Dichos aumentos se observaron, con el mismo grado de significación, tanto en mujeres como en hombres nonagenarios en comparación con sus respectivos adultos, y en hombres septuagenarios en comparación con los adultos, mientras que en las mujeres septuagenarias se apreció una tendencia ( $P=0,079$ ) hacia unos niveles mayores que las adultas (Fig. 26.B1). Al analizar el ratio de IL-2, parámetro que relaciona ambos tipos de muestra, tanto los adultos como los nonagenarios liberaron menos IL-2 en el plasma (+)LPS que en el plasma (-)LPS, obteniendo unos valores menores a 1 en ambos grupos de edades. Los septuagenarios, por el contrario, mostraron una mayor liberación de dicha citoquina en presencia de LPS que en su ausencia, observando unos ratios mayores ( $P \leq 0,001$ ) en estos que en los adultos y en los nonagenarios. Al separar el análisis de mujeres y hombres, los ratios de los septuagenarios fueron mayores ( $P \leq 0,01$ ) que en los adultos y en los nonagenarios, tanto en mujeres como en hombres (Fig. 26.C1). Los niveles de IL-1 $\beta$  en el plasma (-)LPS aparecieron aumentados ( $P \leq 0,001$ ) en los septuagenarios en comparación con los adultos, tanto en hombres ( $P \leq 0,01$ ) como en mujeres ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 26.A2). Los hombres septuagenarios presentaron una tendencia ( $P=0,056$ ) hacia unos niveles mayores que las mujeres de la misma edad. Los niveles de IL-1 $\beta$  aumentaron ( $P \leq 0,01$ ) en los nonagenarios en relación a los adultos, pero fueron menores ( $P=0,091$ ) que en los septuagenarios. Los hombres nonagenarios mostraron unos valores mayores ( $P \leq 0,05$ ) que los adultos del mismo género, mientras que en las mujeres se observó una tendencia ( $P=0,052$ ) de dicho aumento. En cuanto al plasma (+)LPS, en los septuagenarios tuvo lugar un aumento ( $P \leq 0,01$ ) de los niveles de IL-1 $\beta$  con respecto a los adultos. Sin embargo, tras ~~el~~ <sup>el</sup> análisis de mujeres y hombres por separado, dicho aumento sólo apareció a modo de tendencia ( $P=0,057$  en las mujeres y  $P=0,082$  en los hombres). Los valores en los nonagenarios resultaron ser mayores ( $P \leq 0,001$ ) que en los adultos, tanto en mujeres como en hombres ( $P \leq 0,01$ ) (Fig. 26.B2). En cuanto al ratio de IL-1 $\beta$ , el grupo de los nonagenarios mostraron los mayores valores, presentando diferencias ( $P \leq 0,001$ ) en relación a los adultos y los septuagenarios. El análisis por género y edad reveló que tanto en mujeres como en hombres, los ratios en los



nonagenarios fueron mayores que en los adultos ( $P \leq 0,001$ ) y los septuagenarios ( $P \leq 0,01$ ) (Fig. 26.C2). Además, se apreció unos valores menores ( $P \leq 0,05$ ) en los hombres nonagenarios que en las mujeres de la misma edad. Los niveles de **IL-6** en el plasma (-)LPS y en el plasma (+)LPS aumentaron ( $P \leq 0,001$ ) tanto en el grupo de septuagenarios como en el de los nonagenarios con respecto al grupo de los adultos. Al analizar ambos sexos y las distintas edades por separado, en el plasma (-)LPS (Fig. 26.A3), los septuagenarios presentaron unos valores mayores de IL-6 en comparación con los adultos ( $P \leq 0,01$ ), y los nonagenarios con respecto a los adultos ( $P \leq 0,001$ ), tanto en las mujeres como en los hombres. En el plasma (+)LPS (Fig. 26.B3), en los hombres septuagenarios y nonagenarios se apreciaron unos niveles mayores ( $P \leq 0,05$ ) que en los adultos, y sólo las nonagenarias mostraron niveles mayores ( $P \leq 0,01$ ) en comparación con las adultas. Aunque no se encontraron diferencias significativas en el ratio de IL-6 entre los distintos grupos experimentales, en los adultos y los nonagenarios los valores fueron similares, mientras que los septuagenarios presentaron ratios mayores (Fig. 26.C3). Tanto en el plasma (-)LPS como en el plasma (+)LPS, los niveles de **TNF- $\alpha$**  aumentaron en el grupo de los septuagenarios ( $P \leq 0,01$ ) y nonagenarios ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,001$ , respectivamente) con respecto a los adultos. En el plasma (-)LPS (Fig. 26.A4), al analizar mujeres y hombres por separado, los septuagenarios de ambos sexos mostraron unos niveles mayores ( $P \leq 0,05$ ) que sus respectivos adultos, y sólo en las mujeres nonagenarias resultaron ser mayores que en las adultas. En el caso del plasma (+)LPS (Fig. 26.B4), los hombres septuagenarios mostraron unos niveles mayores ( $P \leq 0,05$ ) que los adultos del mismo género, mientras que en las mujeres dicha diferencia se observó en forma de tendencia ( $P = 0,093$ ). Tanto en las mujeres como en los hombres nonagenarios tuvo lugar un aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  en relación a los adultos ( $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,01$ , respectivamente). En el ratio de TNF- $\alpha$  se apreció que el grupo de los septuagenarios poseían niveles mayores ( $P \leq 0,05$ ) que los adultos, y el grupo de los nonagenarios mucho mayores ( $P \leq 0,001$ ) que los adultos y los septuagenarios. Al analizar los factores género y edad conjuntamente, las mujeres septuagenarias presentaron una tendencia ( $P = 0,078$ ) hacia unos niveles mayores con respecto a las adultas. Además, tanto en las mujeres como en los hombres nonagenarios, los ratios aumentaron ( $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,01$ , respectivamente) en comparación con sus respectivos grupos de adultos y septuagenarios (Fig. 26.C4). Los niveles de **IL-8** en el plasma (-)LPS fueron mayores ( $P \leq 0,001$ ), tanto en los septuagenarios como en los nonagenarios, en relación a los adultos. Dichos aumentos

continuaron siendo significativos al analizar mujeres y hombres por separado, muy significativos ( $P \leq 0,01$ ) en los septuagenarios y significativos ( $P \leq 0,05$ ) en los nonagenarios (Fig. 26.A5). En cuanto a los niveles de IL-8 en el plasma (+)LPS, los septuagenarios y los nonagenarios mostraron unos niveles mayores ( $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,001$ , respectivamente) que el grupo de los adultos. Al analizar ambos sexos por separado, los niveles de IL-8 aparecieron aumentados ( $P \leq 0,001$ ) en las mujeres nonagenarias con respecto a las adultas (Fig. 26.B5), mientras que en hombres, los niveles aumentaron ( $P \leq 0,05$ ) en los septuagenarios en comparación con los adultos. Además, los hombres nonagenarios presentaron una tendencia ( $P=0,055$ ) hacia unos niveles mayores en relación a los adultos, y otra tendencia ( $P=0,063$ ) hacia unos niveles menores en relación a los septuagenarios. El ratio de IL-8 fue mayor en los septuagenarios ( $P \leq 0,01$ ) y los nonagenarios ( $P \leq 0,001$ ) con respecto al grupo de los adultos. Dicha diferencia en los septuagenarios, se observó únicamente en los hombres ( $P \leq 0,001$ ), mientras que el aumento en los nonagenarios se apreció tanto en las mujeres como en los hombres ( $P \leq 0,01$ ) (Fig. 26.C5). Finalmente, los niveles de IL-10 en el plasma (-)LPS aumentaron en el grupo de los septuagenarios ( $P \leq 0,001$ ), y en nonagenarios pero en menor medida ( $P \leq 0,01$ ), en relación a los adultos. Además, los nonagenarios presentaron una tendencia ( $P=0,058$ ) hacia unos niveles menores que el grupo de los septuagenarios. El análisis de mujeres y hombres por separado reveló un aumento ( $P \leq 0,05$ ) de los niveles de IL-10 en los septuagenarios de ambos sexos en comparación con sus respectivos grupos de adultos (Fig. 26.A6). Los niveles de los hombres nonagenarios resultaron ser mayores ( $P \leq 0,05$ ) que en los adultos del mismo género, mientras que en las mujeres sólo se apreció una tendencia ( $P=0,078$ ) en dicha diferencia. En los niveles de IL-10 en el plasma (+)LPS (Fig. 26.B6), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales, aunque en los hombres septuagenarios se observó una tendencia ( $P=0,076$ ) hacia unos niveles mayores con respecto a los adultos del mismo género, y en los hombres nonagenarios otra tendencia hacia niveles menores ( $P=0,085$ ) con respecto a los septuagenarios del mismo género. En cuanto al ratio de IL-10, el grupo de los septuagenarios mostraron unos niveles menores que los adultos ( $P \leq 0,01$ ) y los nonagenarios ( $P \leq 0,05$ ). Dichas diferencias sólo fueron significativas, con el mismo grado, en las mujeres (Fig. 26.C6). Además tanto las mujeres adultas como las nonagenarias presentaron unas tendencias ( $P=0,068$  y  $P=0,066$ , respectivamente) hacia unos niveles mayores que los hombres de sus respectivas edades.

**Tabla XX.** Niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 (pg/ml) en el plasma procedente de sangre periférica incubada previamente en ausencia (-)/presencia (+) de LPS de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), septuagenarios (70-79 años) y nonagenarios (90-99 años).

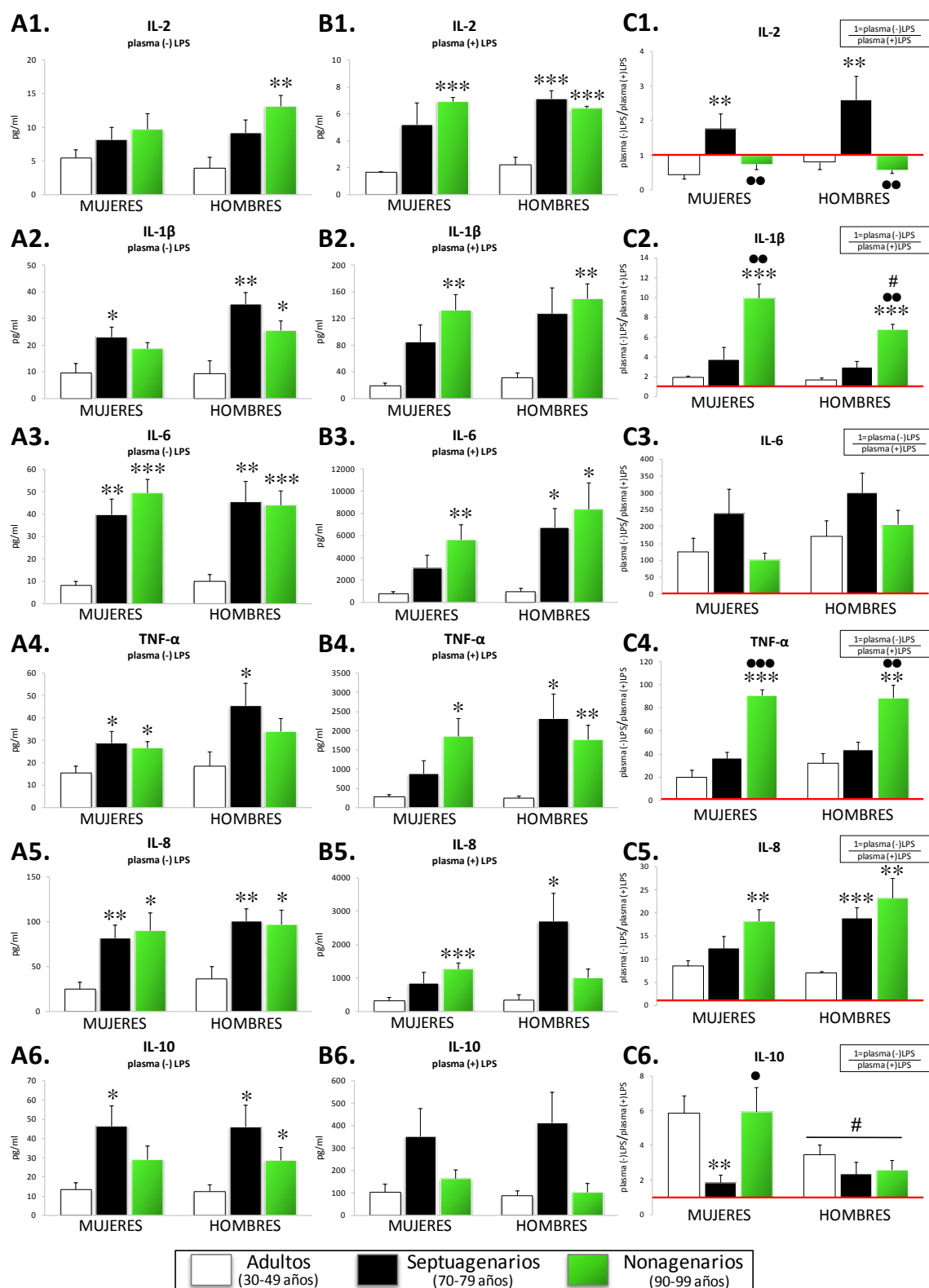
Citoquinas (plasma -/+ LPS)	30-49 años	70-79 años	90-99 años
<b>IL-2 (pg/ml)</b>			
• Plasma (-)LPS			
Población Total	<b>4,74<math>\pm</math>0,99</b>	<b>8,72<math>\pm</math>1,27</b>	<b>11,43<math>\pm</math>1,46</b>
Mujeres	5,44 $\pm$ 1,23	8,18 $\pm$ 1,87	9,70 $\pm$ 2,35
Hombres	3,92 $\pm$ 1,63	9,25 $\pm$ 1,86	13,16 $\pm$ 1,63
• Plasma (+)LPS			
Población Total	<b>1,92<math>\pm</math>0,26</b>	<b>6,18<math>\pm</math>0,93</b>	<b>6,68<math>\pm</math>0,21</b>
Mujeres	1,67 $\pm$ 0,06	5,20 $\pm$ 1,61	6,89 $\pm$ 0,33
Hombres	2,22 $\pm$ 0,55	7,19 $\pm$ 0,58	6,46 $\pm$ 0,16
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/ml)</b>			
• Plasma (-)LPS			
Población Total	<b>9,6<math>\pm</math>2,8</b>	<b>29,3<math>\pm</math>11,4</b>	<b>22,3<math>\pm</math>7,5</b>
Mujeres	9,7 $\pm$ 3,5	23,1 $\pm$ 3,8	18,9 $\pm$ 2,1
Hombres	9,5 $\pm$ 4,6	35,4 $\pm$ 4,3	25,7 $\pm$ 3,4
• Plasma (+)LPS			
Población Total	<b>26<math>\pm</math>4</b>	<b>102<math>\pm</math>22</b>	<b>141<math>\pm</math>16</b>
Mujeres	20 $\pm$ 4	85 $\pm$ 26	133 $\pm$ 24
Hombres	32 $\pm$ 7	128 $\pm$ 38	150 $\pm$ 22
<b>IL-6 (pg/ml)</b>			
• Plasma (-)LPS			
Población Total	<b>9,2<math>\pm</math>1,7</b>	<b>42,7<math>\pm</math>5,6</b>	<b>46,8<math>\pm</math>4,4</b>
Mujeres	8,4 $\pm$ 1,7	39,8 $\pm$ 7,1	49,5 $\pm$ 6,1
Hombres	10,1 $\pm$ 3,2	45,6 $\pm$ 9,1	44,0 $\pm$ 6,6
• Plasma (+)LPS			
Población Total	<b>879<math>\pm</math>159</b>	<b>4926<math>\pm</math>1177</b>	<b>7151<math>\pm</math>1446</b>
Mujeres	795 $\pm$ 188	3089 $\pm$ 1147	5675 $\pm$ 1352
Hombres	979 $\pm$ 286	6763 $\pm$ 1702	8381 $\pm$ 2405
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>			
• Plasma (-)LPS			
Población Total	<b>17<math>\pm</math>3</b>	<b>37<math>\pm</math>6</b>	<b>30<math>\pm</math>3</b>
Mujeres	16 $\pm$ 3	29 $\pm$ 5	27 $\pm$ 3
Hombres	19 $\pm$ 6	46 $\pm$ 10	34 $\pm$ 6
• Plasma (+)LPS			
Población Total	<b>268<math>\pm</math>33</b>	<b>1605<math>\pm</math>406</b>	<b>1826<math>\pm</math>282</b>
Mujeres	283 $\pm$ 49	882 $\pm$ 350	1868 $\pm$ 458
Hombres	250 $\pm$ 47	2328 $\pm$ 627	1783 $\pm$ 368
<b>IL-8 (pg/ml)</b>			
• Plasma (-)LPS			
Población Total	<b>31<math>\pm</math>7</b>	<b>92<math>\pm</math>10</b>	<b>94<math>\pm</math>12</b>
Mujeres	25 $\pm$ 7	82 $\pm$ 14	90 $\pm$ 20
Hombres	37 $\pm$ 13	101 $\pm$ 14	97 $\pm$ 16
• Plasma (+)LPS			
Población Total	<b>339<math>\pm</math>88</b>	<b>1787<math>\pm</math>509</b>	<b>1153<math>\pm</math>156</b>
Mujeres	328 $\pm$ 110	863 $\pm$ 323	1282 $\pm$ 182
Hombres	352 $\pm$ 151	2710 $\pm$ 834	1024 $\pm$ 258
<b>IL-10 (pg/ml)</b>			
• Plasma (-)LPS			
Población Total	<b>13<math>\pm</math>5</b>	<b>46<math>\pm</math>5</b>	<b>29<math>\pm</math>5</b>
Mujeres	13 $\pm$ 4	47 $\pm$ 11	29 $\pm$ 7
Hombres	13 $\pm$ 3	46 $\pm$ 11	29 $\pm$ 6
• Plasma (+)LPS			
Población Total	<b>96<math>\pm</math>21</b>	<b>383<math>\pm</math>88</b>	<b>133<math>\pm</math>29</b>
Mujeres	104 $\pm$ 37	353 $\pm$ 124	164 $\pm$ 40
Hombres	88 $\pm$ 21	413 $\pm$ 137	103 $\pm$ 42

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de 7 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

**Tabla XXI.** Ratio de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 obtenido de la relación entre sus niveles en plasma (-)LPS, a la que se les ha dado el valor 1, y el plasma (+)LPS, de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), septuagenarios (70-79 años) y nonagenarios (90-99 años).

Citoquinas (ratio: plasma (-)LPS/ plasma (+)LPS)	30-49 años	70-79 años	90-99 años
<b>IL-2</b>			
Población Total	<b>0,61<math>\pm</math>0,12</b>	<b>2,14<math>\pm</math>0,29</b>	<b>0,66<math>\pm</math>0,08</b>
Mujeres	0,44 $\pm$ 0,12	1,75 $\pm$ 0,27	0,74 $\pm$ 0,14
Hombres	0,80 $\pm$ 0,20	2,60 $\pm$ 0,50	0,57 $\pm$ 0,08
<b>IL-1<math>\beta</math></b>			
Población Total	<b>1,82<math>\pm</math>0,47</b>	<b>3,42<math>\pm</math>0,77</b>	<b>8,51<math>\pm</math>0,84</b>
Mujeres	1,94 $\pm$ 0,82	3,75 $\pm$ 1,26	9,97 $\pm$ 1,21
Hombres	1,67 $\pm$ 0,43	2,93 $\pm$ 0,60	6,76 $\pm$ 0,54
<b>IL-6</b>			
Población Total	<b>147<math>\pm</math>27</b>	<b>269<math>\pm</math>46</b>	<b>160<math>\pm</math>30</b>
Mujeres	126 $\pm$ 40	238 $\pm$ 74	103 $\pm$ 20
Hombres	172 $\pm$ 47	300 $\pm$ 60	206 $\pm$ 42
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>			
Población Total	<b>25<math>\pm</math>5</b>	<b>40<math>\pm</math>4</b>	<b>90<math>\pm</math>6</b>
Mujeres	20 $\pm$ 6	36 $\pm$ 5	91 $\pm$ 5
Hombres	32 $\pm$ 9	43 $\pm$ 7	89 $\pm$ 11
<b>IL-8</b>			
Población Total	<b>7,8<math>\pm</math>0,7</b>	<b>15,3<math>\pm</math>2,0</b>	<b>20,1<math>\pm</math>2,5</b>
Mujeres	8,5 $\pm$ 1,2	12,4 $\pm$ 2,6	18,3 $\pm$ 2,5
Hombres	7,1 $\pm$ 0,3	18,8 $\pm$ 2,3	23,3 $\pm$ 4,3
<b>IL-10</b>			
Población Total	<b>4,75<math>\pm</math>0,67</b>	<b>2,12<math>\pm</math>0,41</b>	<b>4,27<math>\pm</math>0,88</b>
Mujeres	5,86 $\pm$ 0,99	1,84 $\pm$ 0,44	5,94 $\pm$ 1,41
Hombres	3,45 $\pm$ 0,57	2,34 $\pm$ 0,68	2,60 $\pm$ 0,56

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de 7 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.



**Figura 26.** Niveles de las citoquinas IL-2 (A1, B1), IL-1 $\beta$  (A2, B2), IL-6 (A3, B3), TNF- $\alpha$  (A4, B4), IL-8 (A5, B5) e IL-10 (A6, B6) (pg/ml) en el plasma procedente de sangre periférica incubada en ausencia de LPS (A), en presencia de LPS (B), y el ratio entre ambas muestras (C), de mujeres y hombres adultos (30-49 años), septuagenarios (70-79 años) y nonagenarios (90-99 años). Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 7 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en septuagenarios. # $P \leq 0.05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.3.3.3. Plasma

Los resultados obtenidos en relación a los niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 en el plasma procedente de sangre periférica, se muestran en la tabla XXII y en la figura 27.

**Tabla XXII.** Niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 (pg/ml) en el plasma procedente de sangre periférica de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), septuagenarios (70-79 años) y nonagenarios (90-99 años).

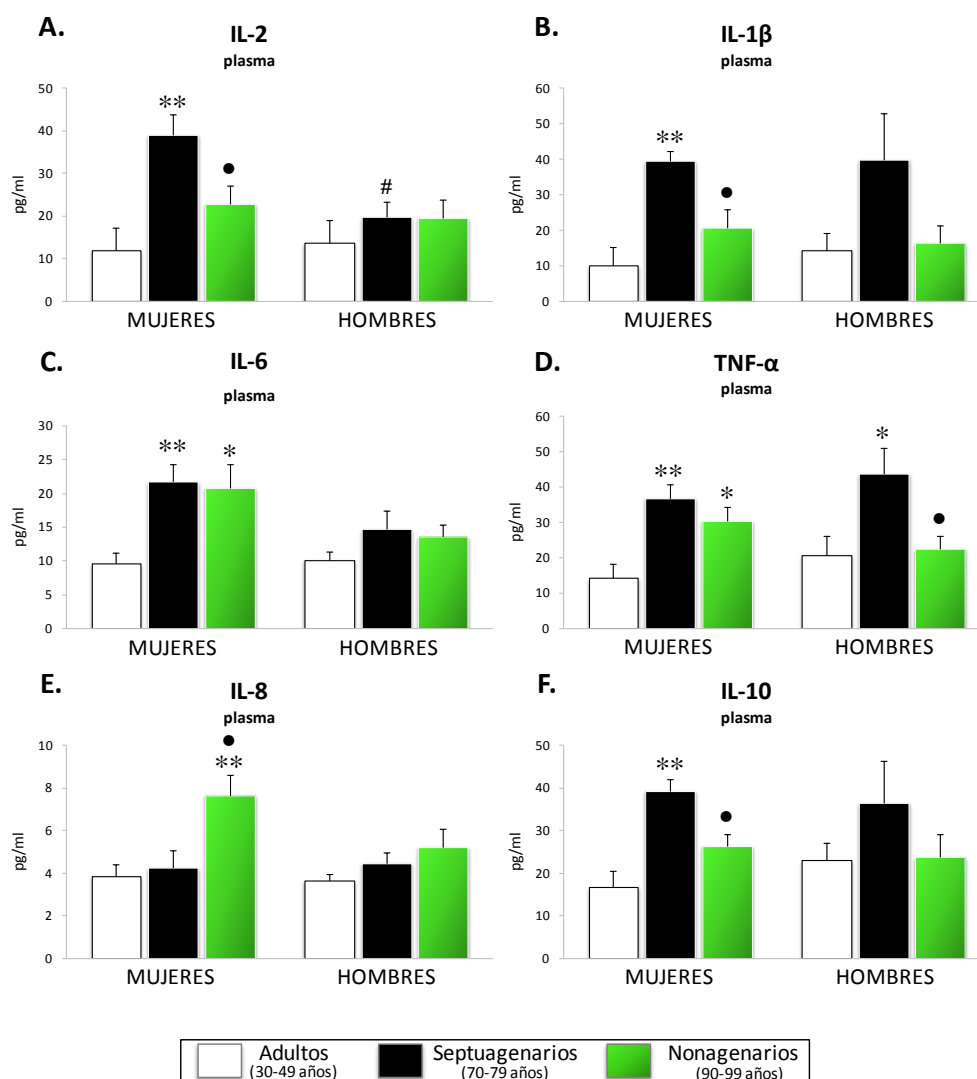
Citoquinas (plasma)	30-49 años	70-79 años	90-99 años
<b>IL-2 (pg/ml)</b>			
Población Total	12,8 $\pm$ 3,7	27,4 $\pm$ 4,2	21,4 $\pm$ 2,8
Mujeres	11,9 $\pm$ 5,3	39,1 $\pm$ 4,9	22,9 $\pm$ 4,1
Hombres	13,6 $\pm$ 5,5	19,7 $\pm$ 3,5	19,6 $\pm$ 4,1
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/ml)</b>			
Población Total	12,2 $\pm$ 3,4	39,7 $\pm$ 6,9	18,8 $\pm$ 3,4
Mujeres	10,1 $\pm$ 5,1	39,4 $\pm$ 3,1	20,8 $\pm$ 5,0
Hombres	14,4 $\pm$ 4,7	39,9 $\pm$ 12,9	16,5 $\pm$ 4,8
<b>IL-6 (pg/ml)</b>			
Población Total	9,9 $\pm$ 0,9	18,2 $\pm$ 2,2	17,5 $\pm$ 2,3
Mujeres	9,6 $\pm$ 1,6	21,7 $\pm$ 2,6	20,8 $\pm$ 3,6
Hombres	10,1 $\pm$ 1,2	14,7 $\pm$ 2,7	13,6 $\pm$ 1,7
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>			
Población Total	17,5 $\pm$ 3,4	40,6 $\pm$ 4,3	26,9 $\pm$ 2,8
Mujeres	14,3 $\pm$ 4,0	36,8 $\pm$ 3,9	30,5 $\pm$ 3,9
Hombres	20,7 $\pm$ 5,5	43,7 $\pm$ 7,3	22,6 $\pm$ 3,6
<b>IL-8 (pg/ml)</b>			
Población Total	3,8 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,7
Mujeres	3,8 $\pm$ 0,6	4,3 $\pm$ 0,8	7,7 $\pm$ 0,9
Hombres	3,7 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 0,9
<b>IL-10 (pg/ml)</b>			
Población Total	19,7 $\pm$ 2,8	37,7 $\pm$ 5,4	25,1 $\pm$ 3,1
Mujeres	16,7 $\pm$ 3,8	39,2 $\pm$ 2,8	26,4 $\pm$ 2,9
Hombres	23,2 $\pm$ 3,9	36,5 $\pm$ 10,1	23,8 $\pm$ 5,5

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de 7 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

En los niveles plasmáticos de **IL-2** no se encontraron diferencias significativas entre mujeres (22 $\pm$ 4 pg/ml) y hombres (17 $\pm$ 3 pg/ml) al omitir el factor edad. El grupo de los septuagenarios presentaron un aumento ( $P\leq 0,05$ ) de los niveles con respecto a los adultos. Dicho aumento sólo se apreció en el grupo de las mujeres ( $P\leq 0,01$ ), dando lugar a unos

niveles menores ( $P \leq 0,05$ ) en los hombres septuagenarios en relación a las mujeres de la misma edad (Fig. 27A). Además, las mujeres nonagenarias mostraron unos niveles menores ( $P \leq 0,05$ ) que las septuagenarias. En los niveles de **IL-1 $\beta$**  en plasma, no se observaron diferencias significativas entre mujeres ( $20 \pm 4$  pg/ml) y hombres ( $22 \pm 5$  pg/ml). En el grupo de los septuagenarios los niveles fueron mayores ( $P \leq 0,001$ ) que en los adultos, y en los nonagenarios menores ( $P \leq 0,01$ ) que en los septuagenarios. Al analizar ambos sexos por separado, en las mujeres septuagenarias se apreciaron unos niveles mayores que en las adultas ( $P \leq 0,01$ ) y las nonagenarias ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 27B), mientras que en los hombres sólo apareció una tendencia ( $P = 0,061$ ) hacia unos niveles mayores en los septuagenarios con respecto a los adultos. En los niveles de **IL-6**, los hombres ( $13 \pm 1$  pg/ml) presentaron una tendencia ( $P = 0,053$ ) hacia unos niveles menores que las mujeres ( $18 \pm 2$  pg/ml). Además, en los septuagenarios y nonagenarios tuvo lugar un aumento ( $P \leq 0,001$  y  $P \leq 0,01$ , respectivamente) de dicha citoquina con respecto al grupo de los adultos, debido principalmente a los altos niveles del grupo de las mujeres, donde tanto las septuagenarias como las nonagenarias mostraron unos niveles mayores ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,05$ , respectivamente) que las adultas (Fig. 27C). En cuanto a los niveles de **TNF- $\alpha$** , no se encontraron diferencias significativas en relación al género ( $26 \pm 3$  pg/ml en mujeres,  $28 \pm 4$  pg/ml en hombres). Los niveles aumentaron en los septuagenarios en comparación con los adultos ( $P \leq 0,001$ ) y los nonagenarios ( $P \leq 0,01$ ), y en los nonagenarios en relación a los adultos ( $P \leq 0,05$ ). Al analizar los factores género y edad conjuntamente, los valores, tanto en las mujeres septuagenarias como en las nonagenarias, resultaron ser mayores ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,05$ , respectivamente) que en las adultas. En el caso de los hombres, los nonagenarios mantuvieron unos niveles similares a los adultos, mientras que los septuagenarios mostraron unos valores mayores ( $P \leq 0,05$ ) que los adultos y los nonagenarios (Fig. 27D). Los niveles plasmáticos de **IL-8** fueron mayores en la edad nonagenaria con respecto a la adulta ( $P \leq 0,01$ ) y la septuagenaria ( $P \leq 0,05$ ). Dichas diferencias se apreciaron únicamente en el grupo de las mujeres, con el mismo grado de significación (Fig. 27E). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-8 entre las mujeres ( $5,3 \pm 0,6$  pg/ml) y los hombres ( $4,5 \pm 0,4$  pg/ml) de la población total, aunque en la década de los 90 se observó una tendencia ( $P = 0,085$ ) hacia unos valores mayores en las mujeres que en los hombres. Finalmente, los niveles plasmáticos de **IL-10** no presentaron diferencias significativas entre hombres ( $27 \pm 4$  pg/ml) y mujeres ( $25 \pm 3$  pg/ml). En los septuagenarios los niveles aparecieron aumentados ( $P \leq 0,01$ )

con respecto a los adultos, mientras que los nonagenarios mostraron unos niveles menores ( $P \leq 0,05$ ) a los observados en los septuagenarios. Dichas diferencias sólo se apreciaron en el grupo de las mujeres, con el mismo grado de significación (Fig. 27F).



**Figura 27.** Niveles (pg/ml) de las citoquinas IL-2 (A), IL-1β (B), IL-6 (C), TNF-α (D), IL-8 (E) e IL-10 (F) en el plasma procedente de sangre periférica de mujeres y hombres adultos (30-49 años), septuagenarios (70-79 años) y nonagenarios (90-99 años). Cada columna representa la media ± el error estándar de 7 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. • $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en septuagenarios. # $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.



#### 4.3.4. Valoración de la proteína C reactiva (PCR), glutatión total y capacidad antioxidante total en plasma

En este cuarto subapartado, al igual que en el primero (4.3.1.) y el segundo (4.3.2.), los grupos de edades analizados fueron adultos (30-49 años), maduros (60-79 años) y nonagenarios (90-99 años), tanto mujeres como hombres.

Los resultados obtenidos en relación a los niveles plasmáticos del mediador inflamatorio proteína C reactiva (PCR), y de las defensas antioxidantes, glutatión total y capacidad antioxidantes total, se muestran en la tabla XXIII y la figura 28.

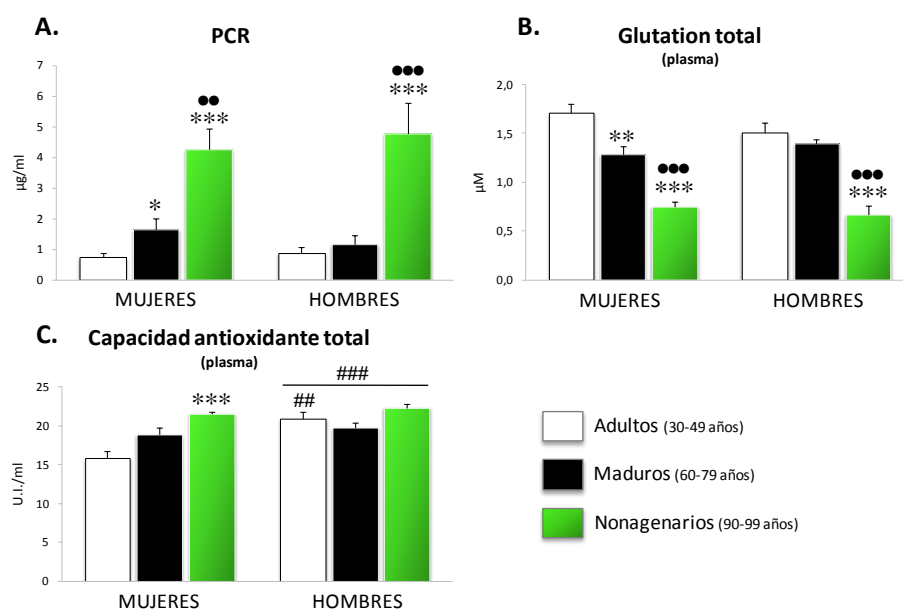
**Tabla XXIII.** Niveles de PCR ( $\mu\text{g/ml}$ ), glutatión total ( $\mu\text{M}$ ) y capacidad antioxidante total (U.I./ml) en el plasma de sangre periférica de una población compuesta por mujeres y hombres (población total) adultos (30-49 años), maduros (60-79 años) y nonagenarios (90-99 años).

	30-49 años	60-79 años	90-99 años
<b>PCR (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>0,82<math>\pm</math>0,17</b>	<b>1,42<math>\pm</math>0,16</b>	<b>4,40<math>\pm</math>3,19</b>
<b>Mujeres</b>	0,74 $\pm$ 0,13	1,66 $\pm$ 0,34	4,26 $\pm$ 0,69
<b>Hombres</b>	0,89 $\pm$ 0,19	1,18 $\pm$ 0,27	4,78 $\pm$ 1,01
<b>Glutathion total en plasma (<math>\mu\text{M}</math>)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>1,61<math>\pm</math>0,05</b>	<b>1,34<math>\pm</math>0,06</b>	<b>0,71<math>\pm</math>0,05</b>
<b>Mujeres</b>	1,71 $\pm$ 0,09	1,29 $\pm$ 0,08	0,75 $\pm$ 0,05
<b>Hombres</b>	1,51 $\pm$ 0,10	1,39 $\pm$ 0,04	0,67 $\pm$ 0,09
<b>Capacidad antioxidantes total en plasma (U.I./ml)</b>			
<b>Población Total</b>	<b>18,4<math>\pm</math>0,5</b>	<b>19,3<math>\pm</math>0,5</b>	<b>21,9<math>\pm</math>0,5</b>
<b>Mujeres</b>	15,9 $\pm$ 0,9	18,8 $\pm$ 0,9	21,5 $\pm$ 0,3
<b>Hombres</b>	20,9 $\pm$ 0,9	19,7 $\pm$ 0,7	22,3 $\pm$ 0,5

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de 9-25 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

En los niveles de la **PCR** no se apreciaron diferencias significativas entre mujeres (2,22 $\pm$ 0,31  $\mu\text{g/ml}$ ) y hombres (1,63 $\pm$ 0,28  $\mu\text{g/ml}$ ), pero sí con la edad ( $P \leq 0,001$ ). Los maduros mostraron unos niveles mayores ( $P \leq 0,05$ ) que los adultos, hecho que se observó especialmente en mujeres, con el mismo grado de significación (Fig. 28A). Al comparar los valores entre los nonagenarios y los otros dos grupos de edades, en los primeros fueron mayores ( $P \leq 0,001$ ) que en los adultos y maduros. Al analizar mujeres y hombres por separado, los nonagenarios presentaron unos niveles mayores ( $P \leq 0,001$ ) que los adultos,

tanto en mujeres como en hombres. Además, los niveles de la PCR aumentaron en los nonagenarios con respecto a los maduros ( $P \leq 0,01$  en mujeres y  $P \leq 0,001$  en hombres). En los niveles de **glutación total** en plasma, las mujeres y los hombres aparecieron con valores similares ( $1,33 \pm 0,03 \mu\text{M}$  y  $1,25 \pm 0,04 \mu\text{M}$ , respectivamente). El factor edad ejerció un efecto altamente significativo ( $P \leq 0,001$ ) sobre sus niveles. En los maduros los valores resultaron ser menores ( $P \leq 0,01$ ) que en los adultos, siendo apreciable únicamente en mujeres, con el mismo grado de significación (Fig. 28B). En los nonagenarios tuvo lugar una disminución ( $P \leq 0,001$ ) de los niveles de glutación en relación a los adultos y maduros. Dichas disminuciones se observaron tanto en mujeres como en hombres ( $P \leq 0,001$ ). En los niveles de la **capacidad antioxidante total** en plasma, el género y la edad ejercieron una alta influencia ( $P \leq 0,001$ ) sobre sus valores, y se apreció una interacción muy significativa ( $P \leq 0,01$ ) entre ambos factores. En los nonagenarios, los niveles aumentaron ( $P \leq 0,01$ ) en comparación con los adultos y maduros. Por otro lado, los hombres ( $20,96 \pm 0,42 \text{ U.I./ml}$ ) presentaron unos valores mayores ( $P \leq 0,001$ ) que las mujeres ( $18,74 \pm 0,37 \text{ U.I./ml}$ ), hecho que fue observado especialmente en la edad adulta ( $P \leq 0,01$ ). Al analizar ambos factores conjuntamente, las mujeres nonagenarias mostraron unos niveles mayores ( $P \leq 0,001$ ) que las adultas (Fig. 28C), mientras que en los hombres sólo se apreció una tendencia ( $P = 0,064$ ) hacia unos valores mayores en los nonagenarios con respecto a los maduros.



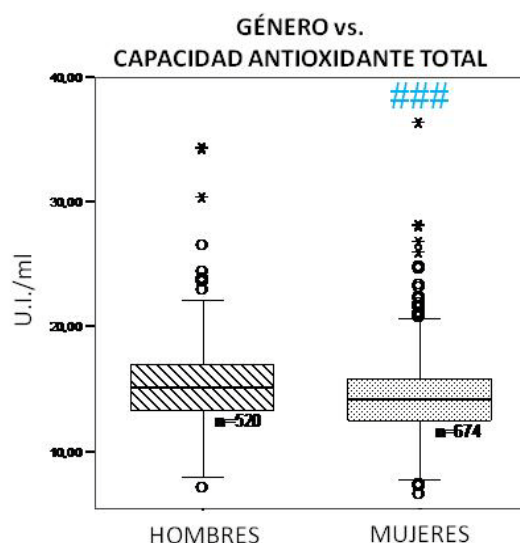
**Figura 28.** Niveles de PCR ( $\mu\text{g/ml}$ ) (A), glutación total ( $\mu\text{M}$ ) (B) y capacidad antioxidante total (U.I./ml) (C) en el plasma de sangre periférica de una población compuesta por mujeres y hombres adultos (30-49 años), maduros (60-79 años) y nonagenarios (90-99 años). Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 9-

25 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en adultos. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en maduros. ### $P \leq 0,001$ , ## $P \leq 0,01$  con respecto al correspondiente valor obtenido en mujeres.

#### 4.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL Y SU RELACIÓN CON DIVERSOS ÍNDICES FUNCIONALES Y PATOLOGÍAS

A continuación se presentan los niveles plasmáticos de la capacidad antioxidante total (TAC) en una amplia población de hombres y mujeres mayores de 65 años pertenecientes al “Estudio Toledo para un Envejecimiento Saludable” (ETES), y su posible relación con diversos índices funcionales, así como con patologías cardiovasculares y metabólicas.

Como se puede apreciar en la figura 29, los niveles plasmáticos de TAC fueron menores ( $P \leq 0,001$ ) en las mujeres ( $14,41 \pm 0,12$  U.I./ml) en relación a los hombres ( $15,42 \pm 0,14$  U.I./ml).



**Figura 29.** Niveles de capacidad antioxidante total plasmática (U.I./ml) de hombres y mujeres mayores de 65 años. Cada caja representa la mediana (Q2) y el rango entre cuartiles (Q1-Q3) de hombres (Q1 13,27 U.I./ml, Q2 15,14U.I./ml y Q3 16,92U.I./ml; n=520) y mujeres (Q1 12,53U.I./ml, Q2 14,22U.I./ml y Q3 15,81U.I./ml; n=674). ### $P \leq 0,001$  con respecto al correspondiente valor obtenido en hombres. °casos atípicos; \*casos extremos.

No se observó ninguna correlación significativa entre los niveles de TAC y los siguientes test funcionales: la fragilidad según los criterios de Fried, la depresión según la escala

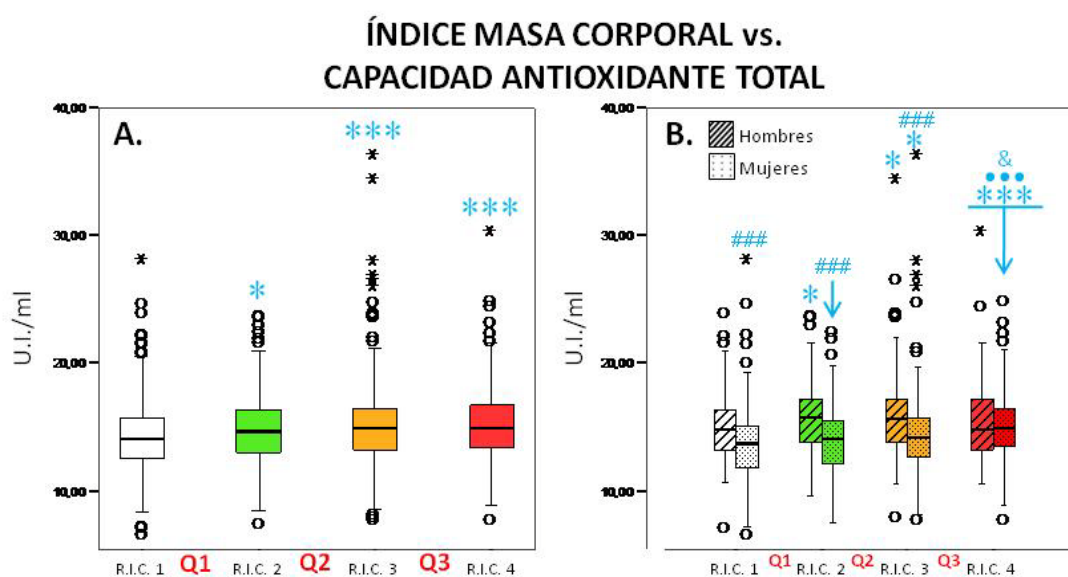
geriátrica de depresión de Yesavage (GDS), la dependencia de actividades básicas de la vida diaria (índice de Katz), ni tampoco con el deterioro cognitivo (test de demencias de Folstein o MMSE). Por el contrario, se apreció una correlación muy significativa (coeficiente de correlación  $(r) = -0,3$ ;  $P \leq 0,01$ ) entre los niveles de TAC y la escala de actividades instrumentales de la vida diaria según el índice de Lawton (escala 0-8, donde 0 indica la mayor dependencia y 8 ninguna). Así, a mayor dependencia a la hora de realizar diferentes tareas de la vida diaria, los niveles de TAC fueron mayores y *viceversa*. Sin embargo, al analizar ambos sexos separadamente, sólo las mujeres mostraron dicha correlación. Al convertir esta escala en una variable categórica de dos grupos, es decir, agrupando individuos *dependientes* (escala del 0 al 7) por un lado y *no dependientes* (8) por otro, el análisis estadístico reveló que efectivamente, los individuos dependientes ( $15,11 \pm 0,12$  U.I./ml;  $n=686$ ) poseían unos valores mayores ( $P \leq 0,001$ ) de TAC que los no dependientes ( $14,34 \pm 0,15$  U.I./ml;  $n=395$ ). Al analizar hombres y mujeres por separado, los niveles de TAC aumentaron ( $P \leq 0,001$ ) en las mujeres con dependencia ( $14,77 \pm 0,16$  U.I./ml;  $n=338$ ) en relación a las no dependientes ( $14,04 \pm 0,17$  U.I./ml;  $n=312$ ). En los hombres no se encontraron diferencias entre ambas situaciones ( $15,44 \pm 0,17$  U.I./ml en dependientes y  $15,46 \pm 0,3$  U.I./ml en no dependientes;  $n=348$  y  $n=83$ , respectivamente). Cabe destacar que tanto en la condición de dependencia como en la de no dependencia, los hombres presentaron unos valores mayores ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,001$ , respectivamente) que las mujeres. En cuanto al índice de masa corporal (IMC), se observó una correlación muy significativa ( $r=0,311$ ;  $P \leq 0,01$ ) entre los niveles plasmáticos de TAC y el IMC, siendo una correlación positiva, es decir, a mayor IMC los niveles de los antioxidantes fueron mayores. Al realizar el análisis de *Pearson* separando hombres y mujeres, no se observó ninguna correlación en los hombres entre ambos parámetros ( $r=0,253$ ;  $P=0,176$ ), mientras que las mujeres presentaron una correlación altamente significativa ( $r=0,409$ ;  $P \leq 0,001$ ). Al dividir los valores del IMC de la población en cuartiles, es decir, al convertir la variable continua IMC en una categórica de 4 grupos, se procedió al análisis de los niveles de antioxidantes totales en cada rango intercuartil (RIC) (tabla XXIV y figura 29). Los niveles de TAC aumentaron ( $P \leq 0,001$ ) a mayor IMC, siendo estadísticamente significativo dicho aumento en el RIC 2 ( $P \leq 0,05$ ), 3 ( $P \leq 0,001$ ) y 4 ( $P \leq 0,001$ ) del IMC con respecto al RIC 1 (Fig. 29A). Al separar el análisis de hombres y mujeres (Fig. 29B), se encontró una tendencia ( $P=0,073$ ) significativa en el aumento de TAC a mayores niveles de IMC en los hombres; el RIC 2 y 3 del IMC mostraron unos valores

mayores ( $P \leq 0,05$ ) de TAC que el RIC 1. En las mujeres, por otro lado, se observó un aumento altamente significativo ( $P \leq 0,001$ ) de TAC a mayores niveles de IMC, ya que los valores fueron mayores ( $P \leq 0,05$ ) en el RIC 3 en relación al RIC 1, y en RIC 4 en comparación con el RIC 1 ( $P \leq 0,001$ ), 2 ( $P \leq 0,001$ ) y 3 ( $P \leq 0,05$ ). Cabe destacar que en el RIC 1, 2 y 3 del IMC, las mujeres presentaron unos valores de TAC menores ( $P \leq 0,001$ ) que los hombres.

**Tabla XXIV.** Niveles de capacidad antioxidante total (U.I./ml) en el plasma de sangre periférica de una población compuesta por hombres y mujeres mayores de 65 años, dividida en función de su índice de masa corporal (IMC) expresado en cuartiles.

ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)							
Rango	Q1	Rango	Q2	Rango	Q3	Rango	Q4
intercuartil 1	intercuartil 2	intercuartil 3	intercuartil 4				
Capacidad antioxidante total (U.I./ml)							
	IMC=	25,9	28,6	31,6			
Población Total	14,35±0,18	14,72±0,17	15,34±0,22	15,16±0,19			
	(n=271)	(n=272)	(n=265)	(n=261)			
	IMC=	25,5	28	30,7			
Hombres	15±0,23	15,54±0,24	15,99±0,31	15,53±0,44			
	(n=135)	(n=121)	(n=130)	(n=61)			
	IMC=	26,3	29,3	32,9			
Mujeres	13,69±0,26	14,06±0,21	14,72±0,32	15,04±0,21			
	(n=136)	(n=151)	(n=135)	(n=170)			

Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar de los valores correspondientes al número de sujetos (n) indicado en cada rango intercuartil y grupo experimental, y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.



**Figura 29.** Niveles de capacidad antioxidante total plasmática (U.I./ml) de sangre periférica de una población (A) compuesta por hombres y mujeres (B) mayores de 65 años, dividida en función de su índice de masa corporal (IMC) expresado en cuartiles: rango intercuartil (RIC) 1, 2, 3 y 4. Cada caja representa la mediana (Q2) y el

rango entre cuartiles (Q1-Q3). \*\*\* $P \leq 0,001$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en el RIC 1 del IMC. \*\* $P \leq 0,001$  con respecto al correspondiente valor obtenido en el RIC 2 del IMC. <sup>§</sup> $P \leq 0,001$  con respecto al correspondiente valor obtenido en el RIC 3 del IMC. <sup>###</sup> $P \leq 0,001$  con respecto al correspondiente valor obtenido en hombres. <sup>°</sup>casos atípicos; <sup>•</sup>casos extremos.

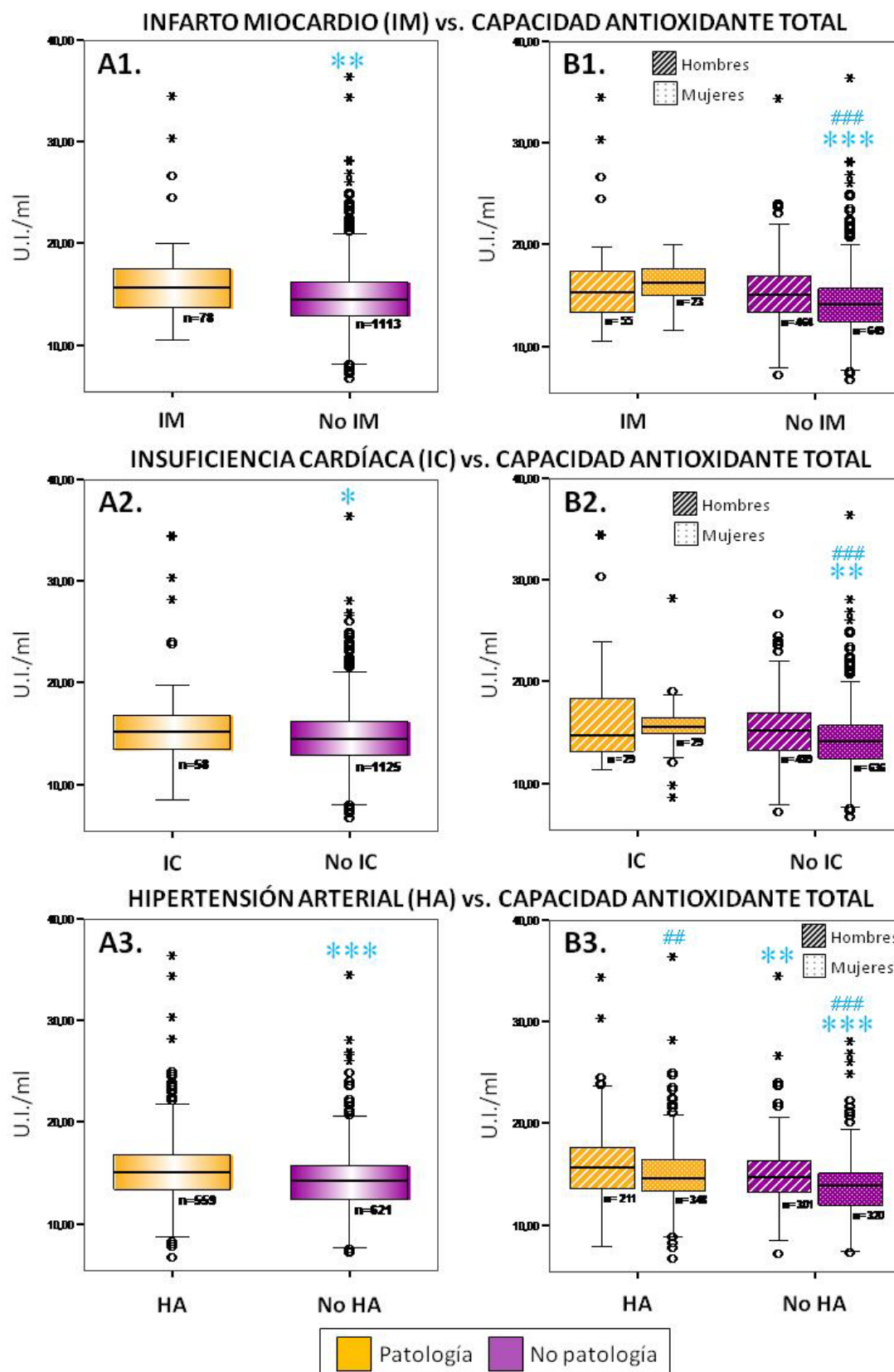
En cuanto a la posible asociación entre la existencia o no de ciertas patologías y los niveles de TAC en plasma, los resultados fueron los siguientes:

No se observaron diferencias significativas en los niveles de TAC entre individuos sanos y pacientes que han tenido una claudicación intermitente, una trombosis venosa profunda, una embolia pulmonar, una fibrilación auricular, un accidente cerebrovascular (trombosis, embolia o hemorragia en el cerebro), ni por el hecho de haber padecido un ataque isquémico transitorio que se recuperó en menos de 24 horas. Tampoco se apreciaron diferencias en los niveles de TAC por el hecho de tener el colesterol alto. Los individuos que habían padecido una angina de pecho ( $15,57 \pm 0,46$  U.I./ml;  $n=71$ ), no mostraron diferencias significativas en los valores de TAC en relación a los que no la habían sufrido ( $14,81 \pm 0,09$  U.I./ml;  $n=1116$ ). Sin embargo, al dividir la población en hombres y mujeres, los niveles de TAC en las mujeres que habían tenido una angina de pecho ( $15,5 \pm 0,53$  U.I./ml;  $n=37$ ) aumentaron ( $P \leq 0,05$ ) con respecto a las que no lo habían sufrido ( $14,36 \pm 0,12$  U.I./ml;  $n=631$ ). En los hombres no se observó dicha relación ( $15,65 \pm 0,78$  U.I./ml con angina de pecho y  $15,41 \pm 0,14$  U.I./ml sin angina de pecho;  $n=34$  y  $n=485$ , respectivamente). Los valores en las mujeres sanas fueron menores ( $P \leq 0,001$ ) que en los hombres sanos, mientras que los niveles en las mujeres y los hombres que habían padecido una angina de pecho, resultaron ser iguales. En las personas que padecían una valvulopatía ( $16,14 \pm 0,64$  U.I./ml;  $n=49$ ) se encontró una tendencia ( $P=0,07$ ) hacia unos niveles mayores de TAC que las que no lo padecían ( $14,78 \pm 0,09$  U.I./ml;  $n=1131$ ). Dicha tendencia apareció significativa ( $P \leq 0,05$ ) en las mujeres ( $15,77 \pm 0,72$  U.I./ml con valvulopatía y  $14,33 \pm 0,11$  U.I./ml sin valvulopatía;  $n=22$  y  $n=642$ , respectivamente), mientras que en los hombres no ( $16,43 \pm 1$  U.I./ml con valvulopatía y  $15,37 \pm 0,13$  U.I./ml sin valvulopatía;  $n=27$  y  $n=489$ , respectivamente). Además, las mujeres sanas mostraron una TAC menor ( $P \leq 0,001$ ) que los hombres sanos, mientras que dichas diferencias en los pacientes con valvulopatía se igualaron. Por otro lado, se observó una tendencia ( $P=0,058$ ) hacia niveles mayores de TAC por el hecho de haber sufrido una intervención en el corazón o en alguna arteria ( $15,78 \pm 0,48$  U.I./ml con intervención y

14,8±0,09 U.I./ml sin intervención; n=68 y n=1122, respectivamente). Las mujeres que habían sufrido una intervención (15,69±0,67 U.I./ml; n=24) mostraron unos niveles mayores ( $P\leq 0,05$ ) que las que no lo habían sufrido (14,38±0,12 U.I./ml; n=646). Los hombres no presentaron diferencias en los valores de TAC por haberse sometido o no a una intervención (15,83±0,66 U.I./ml con intervención y 15,38±0,14 U.I./ml sin intervención; n=44 y n=476, respectivamente). Las mujeres y los hombres que habían sufrido alguna intervención mostraron unos niveles de TAC similares; por el contrario, las mujeres que no la habían sufrido resultaron tener niveles menores ( $P\leq 0,001$ ) que los hombres en las mismas circunstancias. Los niveles de TAC en personas que padecían diabetes mellitus (15,47±0,26 U.I./ml; n=221) tendieron a aumentar ( $P=0,06$ ) en relación a los niveles de personas sanas (14,72±0,95 U.I./ml; n=959). En las mujeres diabéticas (15,24±0,34 U.I./ml; n=122) se apreció un aumento ( $P\leq 0,05$ ) de los valores con respecto a las sanas (14,24±0,12 U.I./ml; n=546), mientras que en los hombres ambos grupos tuvieron niveles similares (15,76±0,39 U.I./ml en diabéticos y 15,35±0,14 U.I./ml en sanos; n=99 y n=413, respectivamente). Cabe destacar que las mujeres y los hombres diabéticos mostraron niveles similares; sin embargo, las mujeres no diabéticas presentaron unos niveles menores ( $P\leq 0,001$ ) que los no diabéticos. La TAC aumentó ( $P\leq 0,01$ ) en personas que habían sufrido un infarto de miocardio (16,07±0,44 U.I./ml; n=78) (Fig. 30.A1) en comparación con las que no (14,77±0,9 U.I./ml; n=1113). Al separar la población en hombres y mujeres (Fig. 30.B1), no se observaron diferencias entre los hombres que sufrieron un infarto (15,96±0,6 U.I./ml; n=55) y los que no lo sufrieron (15,36±0,14 U.I./ml; n=464). En mujeres, sin embargo, tuvo lugar un aumento ( $P\leq 0,001$ ) de la TAC en las infartadas (16,31±0,45 U.I./ml; n=23) frente a las sanas (14,34±0,12 U.I./ml; n=649). Además, entre los individuos sin infarto, las mujeres mostraron unos niveles menores ( $P\leq 0,001$ ) que los hombres, mientras que los hombres y las mujeres con dicha patología presentaron valores similares. En las personas con una insuficiencia cardíaca (16,45±0,66 U.I./ml; n=58) (Fig. 30.A2), a su vez, los niveles de TAC resultaron ser mayores ( $P\leq 0,05$ ) que en las personas sanas (14,77±0,09 U.I./ml; n=1125). Al analizar hombres y mujeres separadamente (Fig. 30.B2), las diferencias en los niveles entre ambos estados fueron muy significativas en las mujeres ( $P\leq 0,01$ ; 15,7±0,62 U.I./ml con insuficiencia y 14,36±0,12 sin insuficiencia; n=29 y n=636, respectivamente), y en los hombres no se encontraron diferencias (17,19±1,17 U.I./ml con insuficiencia y 15,31±0,13 sin insuficiencia; n=29 y n=489, respectivamente). Entre los individuos sanos, en las mujeres se observaron

unos valores menores ( $P \leq 0,001$ ) que en los hombres, mientras que los hombres y las mujeres con insuficiencia mostraron unos niveles similares. Finalmente, los niveles de TAC en personas con hipertensión arterial ( $15,35 \pm 0,13$  U.I./ml;  $n=559$ ) fueron mayores ( $P \leq 0,001$ ) que en las personas con una tensión arterial normal ( $14,41 \pm 0,12$  U.I./ml;  $n=621$ ) (Fig. 30.A3). Al dividir la población en hombres y mujeres (Fig. 30.B3), en los hipertensos ( $15,86 \pm 0,23$  U.I./ml en hombres y  $15,04 \pm 0,16$  U.I./ml en mujeres;  $n=211$  y  $n=348$ , respectivamente) la TAC resultó ser mayor ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,001$ , respectivamente) que en los normotensos ( $15,13 \pm 0,17$  U.I./ml en hombres y  $13,73 \pm 0,16$  U.I./ml en mujeres;  $n=301$  y  $n=320$ , respectivamente) en ambos sexos. Además, tanto en los hipertensos como en los normotensos, las mujeres presentaron unos niveles menores ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,001$ , respectivamente) que los hombres.





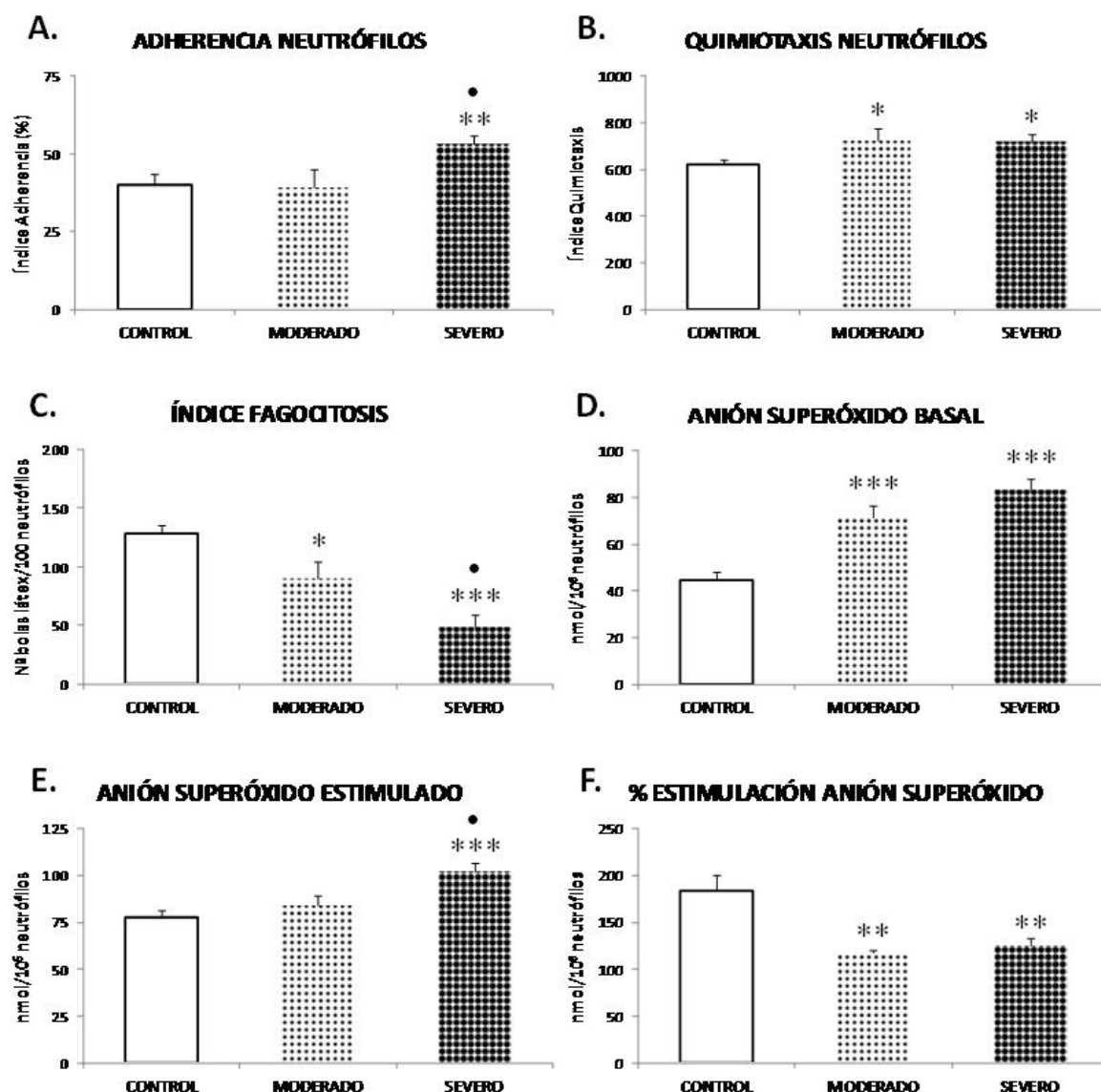
**Figura 30.** Niveles de capacidad antioxidante total plasmática (U.I./ml) con o sin infarto de miocardio (1), insuficiencia cardíaca (2) e hipertensión arterial (3) de una población (A) constituida por hombres y mujeres (B) mayores de 65 años. Cada caja representa la mediana (Q2) y el rango entre cuartiles (Q1-Q3). \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor en el estado patológico. #### $P \leq 0,001$ , ### $P \leq 0,01$  con respecto al correspondiente valor obtenido en hombres.  $\circ$  casos atípicos;  $\blacklozenge$  casos extremos.

#### 4.5. ENVEJECIMIENTO PREMATURO. CAMBIOS EN LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EN LOS NIVELES DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN HOMBRES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC) MODERADA Y SEVERA

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en relación a diversos parámetros de funcionalidad de células inmunológicas, y de niveles de compuestos antioxidantes en un grupo de hombres de 50-70 años con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) con grado moderado y severo, así como en un grupo de hombres sanos de la misma edad.

##### 4.5.1. Capacidad funcional de neutrófilos: Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y niveles de anión superóxido intracelulares

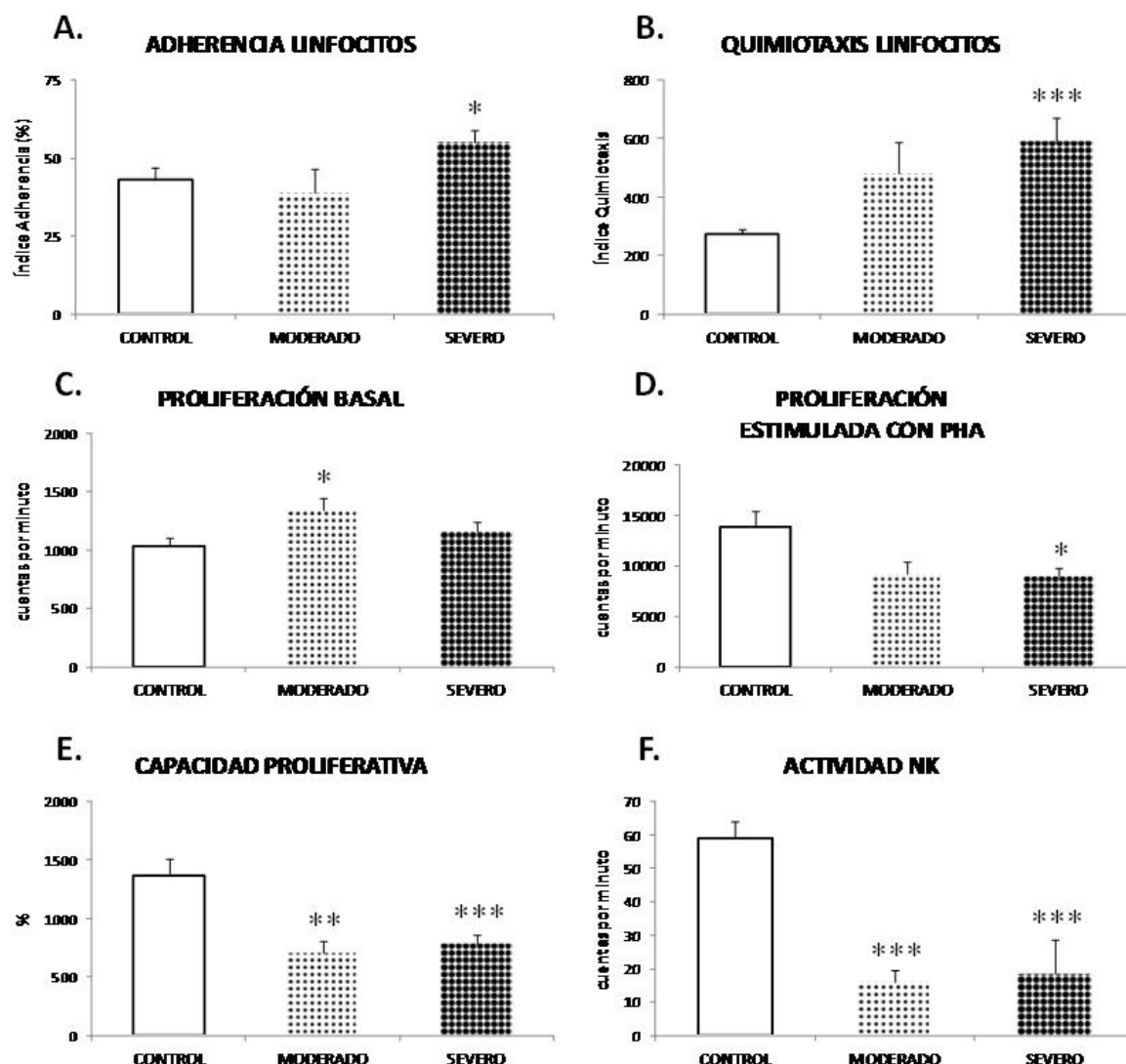
Los índices de **adherencia** (Fig. 31A) del grupo EPOC con grado severo ( $IA = 53 \pm 3$ ) fueron mayores que los observados en los controles ( $IA = 40 \pm 3$ ;  $P \leq 0,01$ ) y los individuos con EPOC moderado ( $IA = 39 \pm 6$ ;  $P \leq 0,05$ ). En los índices de **quimiotaxis** (Fig. 31B), tanto los EPOC severos ( $IQ = 721 \pm 28$ ) como los moderados ( $IQ = 727 \pm 52$ ) mostraron unos niveles mayores ( $P \leq 0,05$ ) que los controles ( $IQ = 620 \pm 25$ ). Los índices de **fagocitosis** (Fig. 31C) disminuyeron en los dos grupos de individuos con EPOC en relación a los del grupo control ( $IF = 128 \pm 8$ ), significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en los moderados ( $IF = 90 \pm 15$ ) y de manera altamente significativa ( $P \leq 0,001$ ) en los severos ( $IF = 49 \pm 10$ ). Además, los EPOC severos presentaron unos índices menores ( $P \leq 0,05$ ) que los moderados. En cuanto a los niveles de anión superóxido en condiciones basales o no estimuladas (Fig. 31D), tanto en los hombres con EPOC moderado ( $72 \pm 5$  nmol/ $10^6$  neutrófilos) como severo ( $83 \pm 5$  nmol/ $10^6$  neutrófilos) se apreciaron unos niveles mayores ( $P \leq 0,001$ ) que en los controles ( $45 \pm 3$  nmol/ $10^6$  neutrófilos). En condiciones estimuladas (Fig. 31E), los pacientes con EPOC severo ( $102 \pm 5$  nmol/ $10^6$  neutrófilos) mostraron unos niveles mayores en comparación con los controles ( $78 \pm 4$  nmol/ $10^6$  neutrófilos;  $P \leq 0,001$ ) y los de grado moderado ( $84 \pm 5$  nmol/ $10^6$  neutrófilos;  $P \leq 0,05$ ). Por el contrario, el porcentaje de estimulación de anión superóxido intracelular (Fig. 31F), parámetro obtenido de la relación entre los niveles en condiciones basales, a la que se les da el valor 100, y estimuladas, apareció disminuido en los EPOC de grado moderado ( $118 \pm 3\%$ ;  $P \leq 0,01$ ) y severo ( $126 \pm 8\%$ ;  $P \leq 0,01$ ) en relación a los controles ( $184 \pm 17\%$ ).



**Figura 31.** Índice de adherencia (% neutrófilos adherentes) (A), índice de quimiotaxis (número de neutrófilos en filtro) (B), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 neutrófilos) (C), y niveles de anión superóxido intracelular (nmol/10<sup>6</sup> neutrófilos) en condiciones basales (D) y estimuladas (E), y el porcentaje de estimulación (%) en los niveles de anión superóxido (F), de neutrófilos de sangre periférica de hombres sanos (controles; n=15) y con EPOC con grado moderado (n=7) y severo (n=15). Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-15 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en individuos control. \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en individuos con EPOC de grado moderado.

#### 4.5.2. Capacidad funcional de linfocitos: Adherencia, quimiotaxis, proliferación y actividad NK

En los índices de **adherencia** (Fig. 32A) los individuos con EPOC severo ( $IA = 55 \pm 4$ ) mostraron un aumento de esta función ( $P \leq 0,05$ ) al compararlos con los controles ( $IA = 43 \pm 4$ ), mientras que no se observaron diferencias en los EPOC moderados ( $IA = 39 \pm 8$ ) en relación a los otros dos grupos experimentales. Los índices de **quimiotaxis** (Fig. 32B) aumentaron ( $P \leq 0,001$ ) en los individuos con el grado severo ( $IQ = 593 \pm 79$ ) con respecto a los controles ( $IQ = 275 \pm 15$ ). Los niveles de esta función en los EPOC moderado ( $IQ = 481 \pm 109$ ) fueron similares a los otros dos grupos. En cuanto a la **proliferación en condiciones basales** (Fig. 32C), en los pacientes de grado moderado ( $1342 \pm 108$  cpm) tuvo lugar un incremento ( $P \leq 0,05$ ) de sus valores en relación a los controles ( $1036 \pm 78$  cpm), mientras que los de grado severo ( $1162 \pm 81$  cpm) no presentaron variaciones con los otros dos grupos. Por otro lado, la proliferación en respuesta al mitógeno PHA (Fig. 32D) disminuyó en los EPOC con respecto a los controles ( $13859 \pm 1642$  cpm), mostrando una tendencia ( $P = 0,089$ ) los de grado moderado ( $9275 \pm 1198$  cpm), y significativamente ( $P \leq 0,05$ ) los de grado severo ( $9008 \pm 877$  cpm). En la capacidad de estimulación proliferativa, parámetro que relaciona los niveles de proliferación en condiciones basales, a la que se les da el valor 100, y estimuladas con PHA (Fig. 32E), ambos grupos de pacientes con EPOC, moderado ( $710 \pm 96\%$ ) y severo ( $790 \pm 74\%$ ), mostraron una disminución de dicha capacidad ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,001$ , respectivamente) en comparación con los sujetos control ( $1371 \pm 140\%$ ). Los niveles de la **actividad NK** (Fig. 32F), disminuyeron ( $P \leq 0,001$ ) en los dos grupos de individuos con EPOC (% lisis=  $16 \pm 4$  en EPOC moderado y % lisis=  $19 \pm 10$  en EPOC severo) en relación a los individuos sanos (% lisis=  $59 \pm 5$ , respectivamente).

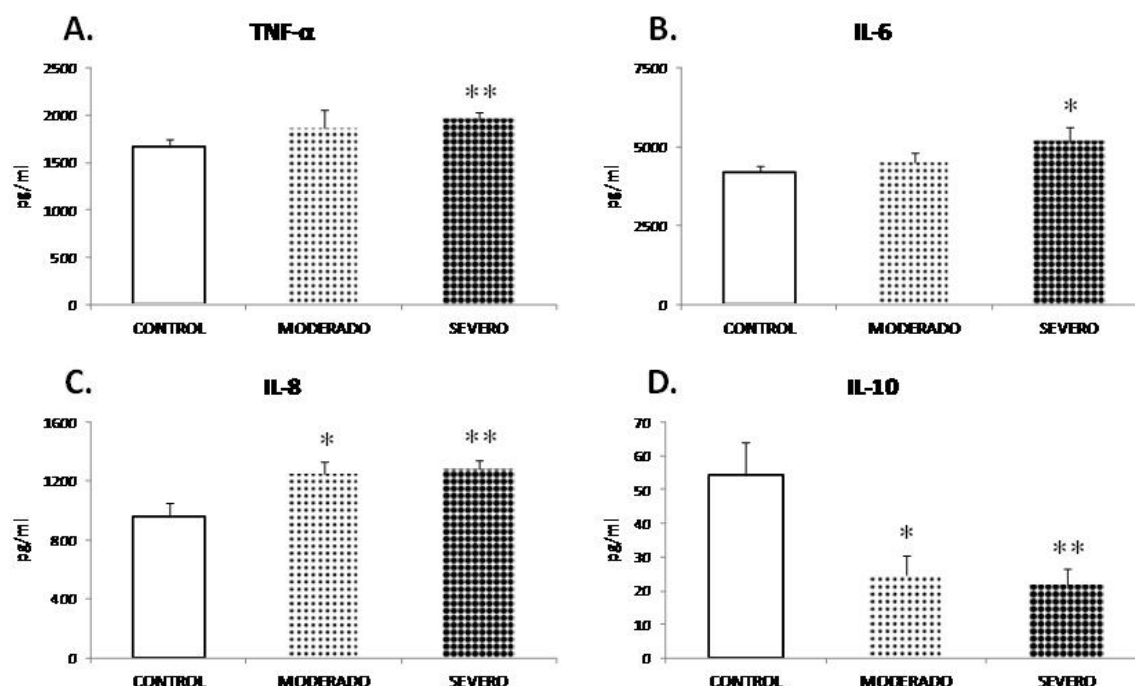


**Figura 32.** Índice de adherencia (% linfocitos adherentes) (A), índice de quimiotaxis (número de linfocitos en filtro) (B), proliferación (cuentas por minuto) basal (C) y en respuesta a PHA (D), capacidad de estimulación proliferativa (%) (E) y actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis de células tumorales) (F) de linfocitos de sangre periférica de hombres sanos (controles; n=15) y con EPOC con grado moderado (n=7) y severo (n=15). Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-15 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en individuos control.

#### 4.5.3. Citoquinas: Niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-10

En los niveles de TNF- $\alpha$  (Fig. 33A) e IL-6 (Fig. 33B), los individuos con EPOC severo ( $1969 \pm 64$  pg/ml y  $5217 \pm 408$  pg/ml, respectivamente) mostraron un aumento ( $P \leq 0,01$  y  $P \leq 0,05$ , respectivamente) con respecto a los controles ( $1665 \pm 79$  pg/ml y  $4208 \pm 190$  pg/ml, respectivamente). En los individuos con EPOC moderado no se observaron cambios significativos en los niveles de TNF- $\alpha$  ( $1865 \pm 188$  pg/ml), ni en los de IL-6 ( $4510 \pm 299$  pg/ml)

con los otros dos grupos de hombres. Los niveles de **IL-8** (Fig. 33C) fueron mayores en ambos grupos de individuos con EPOC ( $1254 \pm 81$  pg/ml en moderados,  $P \leq 0,05$ ;  $1286 \pm 59$  pg/ml en severos,  $P \leq 0,01$ ) en relación a los controles ( $959 \pm 94$  pg/ml). Finalmente, los niveles de **IL-10** (Fig. 33D) disminuyeron tanto en los EPOC moderado ( $25 \pm 6$  pg/ml,  $P \leq 0,05$ ) como en los severos ( $22 \pm 5$  pg/ml,  $P \leq 0,01$ ) en comparación con los controles ( $54 \pm 10$  pg/ml).

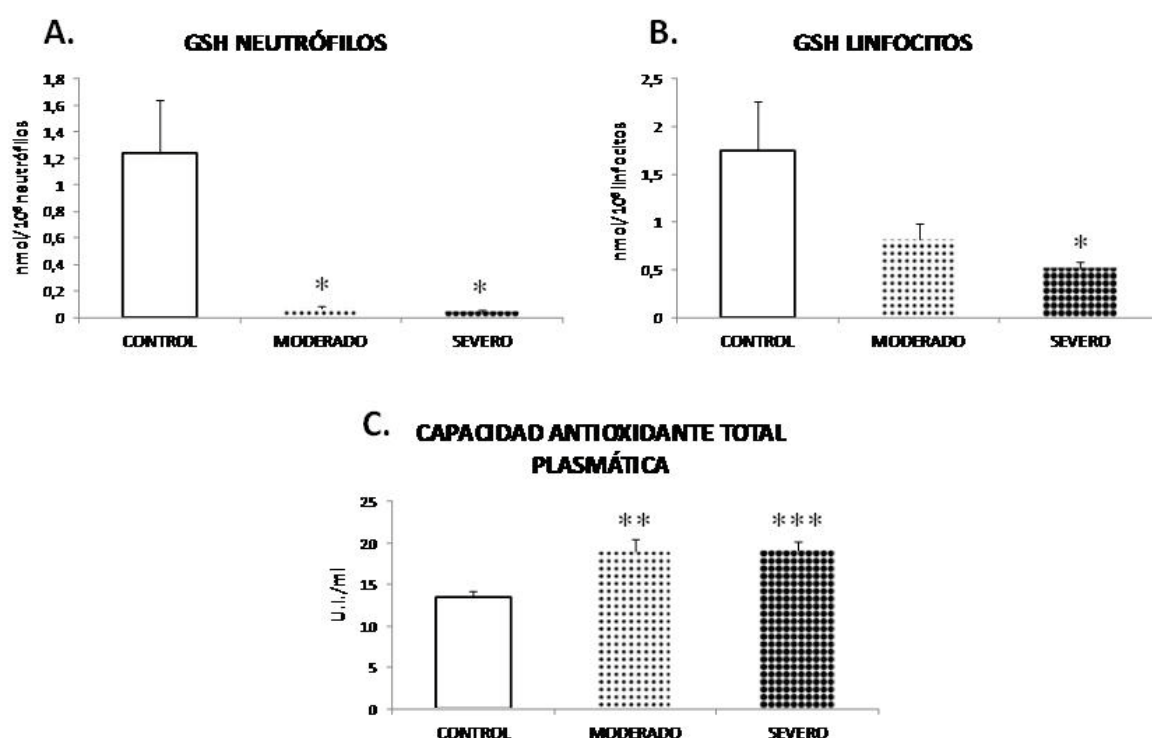


**Figura 33.** Niveles (pg/ml) de las citoquinas TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), IL-8 (C) e IL-10 (D) en el plasma procedente de sangre estimulada previamente con LPS de hombres sanos (controles;  $n=15$ ) y con EPOC con grado moderado ( $n=7$ ) y severo ( $n=15$ ). Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-15 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en individuos control.

#### 4.5.4. Defensas antioxidantes: Glutación total en neutrófilos y linfocitos, y capacidad antioxidante total plasmática

Los niveles de **GSH en neutrófilos** (Fig. 34A) disminuyeron ( $P \leq 0,05$ ) en ambos grupos de EPOC ( $0,07 \pm 0,02$  nmol/ $10^6$  neutrófilos en moderados;  $0,05 \pm 0,01$  nmol/ $10^6$  neutrófilos en severos), con respecto a los controles ( $1,2 \pm 0,4$  nmol/ $10^6$  neutrófilos). **En linfocitos** (Fig. 34B), se apreció una disminución ( $P \leq 0,05$ ) de los niveles de glutación en los EPOC severos ( $0,5 \pm 0,1$

nmol/ $10^6$  linfocitos) en relación a los controles ( $1,8 \pm 0,5$  nmol/ $10^6$  linfocitos), mientras que los moderados ( $0,8 \pm 0,2$  nmol/ $10^6$  linfocitos) no presentaron diferencias significativas en comparación con los otros dos grupos experimentales. Los niveles de **antioxidantes totales** plasmáticos (Fig. 34C) fueron mayores en los individuos con EPOC, tanto con grado moderado ( $19 \pm 1,5$  U.I./ml,  $P \leq 0,01$ ) como severo ( $19,2 \pm 1$  U.I./ml,  $P \leq 0,001$ ), en comparación con los controles ( $13,4 \pm 0,8$  U.I./ml).



**Figura 34.** Glutación total (nmol/ $10^6$  células) en neutrófilos (A) y linfocitos (B), y capacidad antioxidante total plasmática (U.I./ml) (C), de hombres sanos (controles;  $n=15$ ) y con EPOC con grado moderado ( $n=7$ ) y severo ( $n=15$ ). Cada columna representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-15 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en individuos control.



#### 4.6. ENVEJECIMIENTO PATOLÓGICO. ESTUDIO LONGITUDINAL EN EL MODELO MURINO TRIPLE TRANSGÉNICO (PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>SWE</sub>, TAU<sub>P301L</sub>) PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

A continuación, se presentan los resultados sobre los cambios con la edad en el peso, así como en las poblaciones, la funcionalidad y los niveles de compuestos oxidantes y defensas antioxidantes de leucocitos peritoneales en ratones 129/C57BL6 hembras triples transgénicas para la enfermedad de Alzheimer (3xTgAD) y sus controles no transgénicos (NTg), además del análisis de la esperanza de vida media en ambos grupos.

##### 4.6.1. Peso de los animales

Los pesos de los animales 3xTgAD, así como de sus controles NTg, a lo largo de las distintas edades analizadas se muestran en la tabla XXV y en la figura 35. A su vez, en la tabla XXVI se presentan las diferencias estadísticas en el peso entre las distintas edades dentro de cada grupo experimental, mientras que las diferencias estadísticas entre los dos grupos experimentales de animales a una misma edad se muestran en la figura arriba mencionada (figura 35).

**Tabla XXV.** Peso corporal (gramos) de animales NTg y 3xTgAD a lo largo de las distintas edades estudiadas, 2, 4, 6, 12 y 15 meses.

	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
<b>Peso (g)</b>					
<b>NTg</b>	17,1±0,7	19,9±0,8	21,9±0,7	24,6±1,0	23,2±0,6
<b>3xTgAD</b>	18,1±0,4	20,9±0,4	21,1±0,4	23,7±0,4	25,3±0,5

Los datos son la media ± el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de animales.

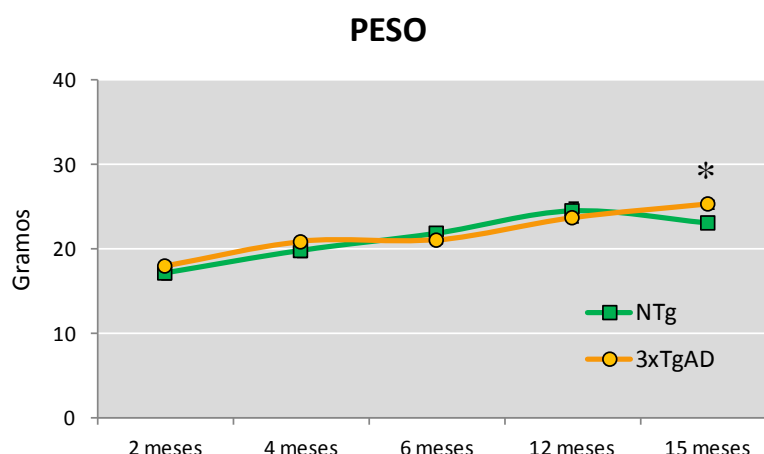
**Tabla XXVI.** Diferencias estadísticas en el peso corporal entre las distintas edades estudiadas (2, 4, 6, 12 y 15 meses) de los animales NTg y 3xTgAD.

PESO											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	***	***	***	***	2 meses	-	***	***	***	***
4 meses	-	-	ns	***	***	4 meses	-	-	ns	***	***
6 meses	-	-	-	***	***	6 meses	-	-	-	***	***
12 meses	-	-	-	-	ns	12 meses	-	-	-	-	*
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

El símbolo “\*” hace referencia a la existencia de diferencias significativas entre las dos edades relacionadas en cada casilla; \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$ . Las diferencias no significativas se expresan como “ns”.



Tanto los animales NTg como los 3xTgAD, mostraron un aumento gradual del peso corporal altamente significativo en comparación con los 2 meses de edad, y a los 12 y 15 meses de edad en relación a los 4 y 6 meses. Además, se observó un aumento del peso a los 15 meses de edad con respecto a los 12 meses sólo en los 3xTgAD (tabla XXVI). Comparando los animales 3xTgAD con los NTg, aquellos a la edad de 15 meses presentaron un mayor ( $P \leq 0,05$ ) peso (Fig. 35).



**Figura 35.** Peso corporal (gramos) de los animales NTg y 3xTgAD a lo largo de las distintas edades estudiadas, 2, 4, 6, 12 y 15 meses. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos. \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en los NTg de la misma edad.

#### 4.6.2. Caracterización y cuantificación de poblaciones leucocitarias peritoneales

La presencia de algunos antígenos de diferenciación leucocitaria de membrana (CD) expresados por las principales células inmunitarias que pueden encontrarse en el peritoneo de ratón, esto es, CD45, CD11b, CD335, CD19, CD5, CD25, CD45RA, CD3, CD4 y CD8, fue analizada por citometría de flujo en animales 3xTgAD y NTg de 2, 4, 6, 12 y 15 meses.

##### 4.6.2.1. Caracterización y cuantificación de macrófagos y células *Natural Killer* (NK)

Los resultados referentes a la cantidad de macrófagos (CD11b+) y células NK (CD335+) de entre las células CD45+ presentes en el peritoneo de los ratones 3xTgAD y NTg, se muestran en la tabla XXVII.

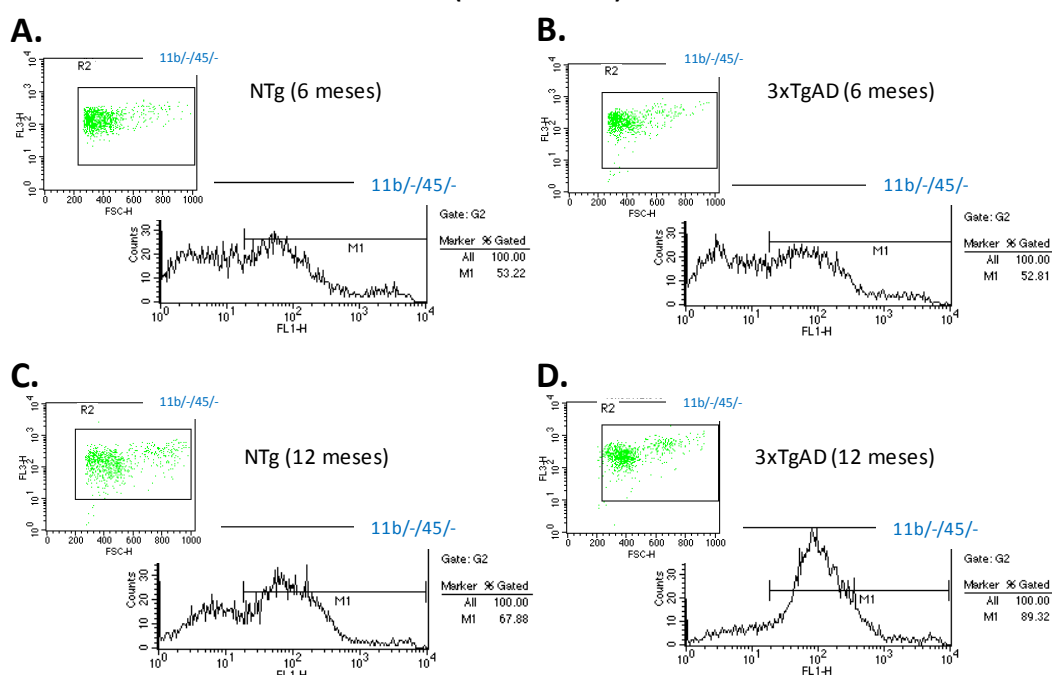
**Tabla XXVII.** Expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria CD11b+ y CD335+ (%) en leucocitos peritoneales procedentes de ratones 3xTgAD y sus respectivos controles NTg, a diferentes edades.

		2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
% CD11b+	NTg	59,43±4,24	63,80±7,07	53,22±3,99	67,97±0,10	72,61±5,66
	3xTgAD	56,51±7,07	81,73±0,71	46,61±4,24	88,35±0,71***	76,14±1,41
% CD335+	NTg	1,60±0,01	2,23±0,83	0,81±0,08	0,97±0,03	0,52±0,09
	3xTgAD	1,19±0,08*	2,26±0,48	0,56±0,02	0,44±0,06**	0,29±0,06

Los datos son la media  $\pm$  el error estándar de 2 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizado por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en los NTg de la misma edad.

Con la edad se observó un aumento en el porcentaje de células **CD11b+**, fundamentalmente macrófagos, tanto en los 3xTgAD como en los NTg (a excepción de los animales de 6 meses), siendo, en general, en los primeros mayor que en los NTg (Fig. 36), especialmente a los 12 meses de edad ( $P \leq 0,001$ ).

#### MACRÓFAGOS (CD45+CD11b+)



**Figura 36.** Expresión de CD45/CD11b en leucocitos peritoneales para un ratón de 6 meses NTg (A) y 3xTgAD (B), y de 12 meses NTg (C) y 3xTgAD (D), por citometría de flujo. Arriba a la izquierda de cada subapartado de la figura puede observarse la muestra peritoneal en complejidad (FSC-H) analizado por la fluorescencia en FL3-H (CD45+). Esta región marcada fue seleccionada para analizar la fluorescencia en FL1-H, en la que emite el fluoróforo unido al anticuerpo anti-CD11b empleado. Se observó la presencia de un pico (M1) que correspondió con los macrófagos.

En cuanto a la expresión de **CD335**, marcador específico de células NK, los resultados mostraron una disminución progresiva a partir de los 4 meses de edad en ambos grupos experimentales, presentando en casi todas las edades analizadas unos niveles menores en los 3xTgAD que en los NTg y significativamente a los 2 y 12 meses de edad ( $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,01$ , respectivamente).

#### 4.6.2.2. Caracterización y cuantificación de linfocitos B y T

Los resultados referentes a los linfocitos B presentes en el peritoneo de los ratones 3xTgAD y NTg, se muestran en la tabla XXVIII.

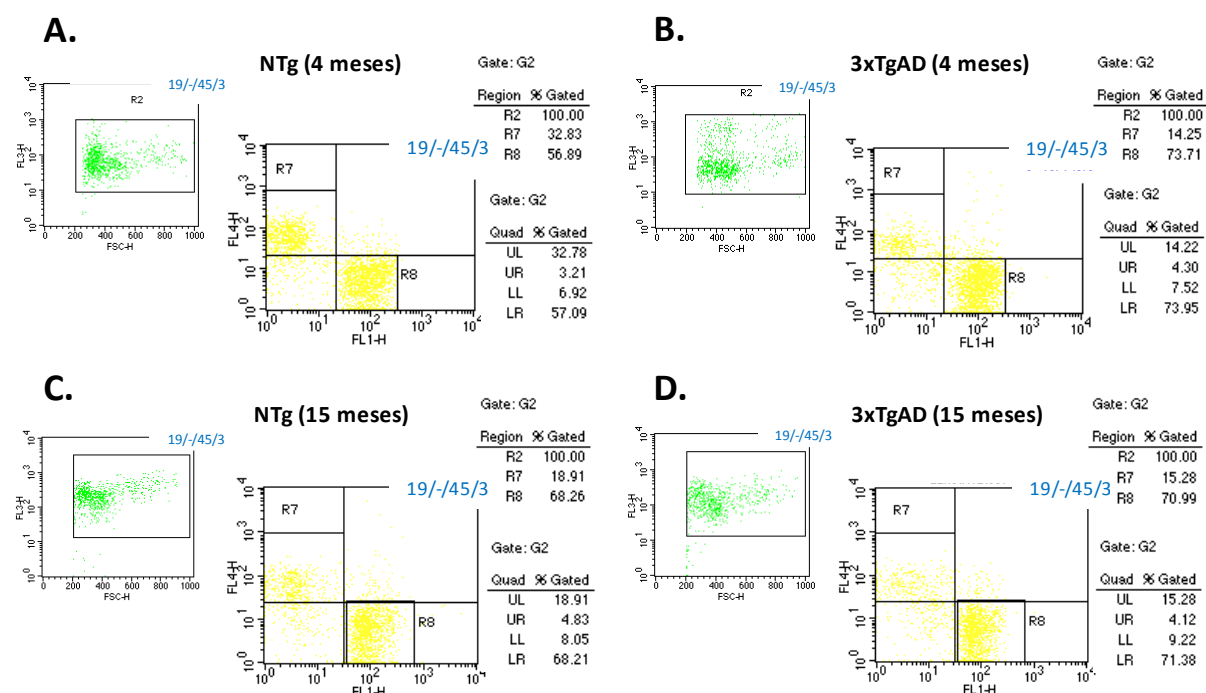
De entre las células positivamente marcadas para CD45, el porcentaje de leucocitos **CD19+**, específico de linfocitos B, mostró un pico a los 4 meses de edad y posteriormente a los 15 meses, tanto en 3xTgAD (Fig. 37B y D, respectivamente) como en NTg (Fig. 37A y C, respectivamente), mostrando en ambos grupos una dinámica similar con la edad. En cuanto a la expresión de **CD25** en este tipo celular, CD que puede estar expresado en varias estirpes leucocitarias ya que forma parte del receptor de IL-2, y por consiguiente indica un tipo de respuesta funcional hacia Th1 en linfocitos B y T activados, en los NTg se observó una disminución a los 4 meses de edad, y un aumento posterior, especialmente en las edades 12 y 15 meses, mientras que en los 3xTgA, los niveles a lo largo del estudio fueron similares. En todas las edades estudiadas, los 3xTgAD presentaron unos niveles mayores que los NTg, siendo significativo a los 2 ( $P \leq 0,01$ ), 4 ( $P \leq 0,05$ ) y 6 ( $P \leq 0,05$ ) meses de edad. Respecto al marcador **CD19+CD5+**, marcador específico de un subtipo de linfocitos B, los llamados B1, se apreció una disminución en los 4 y 6 meses de edad y un aumento posterior a los 12 y 15 meses, especialmente en los animales 3xTgAD con respecto a los NTg en esta última edad ( $P \leq 0,05$ ). Cabe destacar que los resultados obtenidos en los NTg en el porcentaje de CD19+CD25+ y CD19+CD5+, mostraron un error estándar muy bajo, a pesar del reducido tamaño muestral.

**Tabla XXVIII.** Expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria CD19+, CD19+CD25+ y CD19+CD5+ (%) en leucocitos peritoneales procedentes de ratones 3xTgAD y sus respectivos controles NTg, a diferentes edades.

		2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
% CD19+	NTg	61,19±3,04	64,78±5,59	47,62±3,61	68,25±0,64	73,75±3,89
	3xTgAD	52,91±5,37	73,93±0,14	53,16±0,85	59,94±5,37	71,36±0,28
% CD19+CD25+	NTg	42,98±0,14	6,33±0,49	14,52±2,33	50,62±3,11	47,09±1,56
	3xTgAD	56,16±0,71**	58,49±9,90*	35,40±2,40*	56,75±8,27	67,47±7,51
% CD19+CD5+	NTg	31,17±1,56	20,99±2,19	13,99±1,20	33,09±0,71	34,53±2,33
	3xTgAD	38,65±2,83	12,72±2,12	13,40±0,14	40,95±3,46	51,44±0,42*

Los datos son la media ± el error estándar de 2 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizado por duplicado. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en los NTg de la misma edad.

### LINFOCITOS B y LINFOCITOS T (CD45+CD19+) (CD45+CD3+)



**Figura 37.** Expresión de CD45/CD19 y CD45/CD3 en leucocitos peritoneales para un ratón de 4 meses NTg (A) y 3xTgAD (B), y de 15 meses NTg (C) y 3xTgAD (D), por citometría de flujo. Arriba a la izquierda de cada subapartado de la figura puede observarse la muestra peritoneal en complejidad (FSC-H) analizado por la fluorescencia en FL3-H (CD45+). Esta región marcada fue seleccionada para analizar, por un lado, la fluorescencia en FL1-H, en la que emite el fluoróforo unido al anticuerpo anti-CD19, que se correspondió con la presencia de linfocitos B (R8), y por otro lado, la fluorescencia en FL4-H, en la que emite el fluoróforo unido al anticuerpo anti-CD3, correspondiente a la presencia de linfocitos T (R7).

Los resultados correspondientes a los porcentajes de poblaciones de linfocitos T presentes en el peritoneo de los ratones 3xTgAD y NTg, se muestran en la tabla XXIX.

En los animales 3xTgAD el porcentaje de leucocitos **CD3+**, dentro de los positivamente marcados para CD45, correspondientes principalmente a linfocitos T, fue mayor a los 2 y 6 meses que en las otras edades, y en los NTg, lo fue a los 4 y 6 meses. Desde los 4 meses los 3xTgAD mostraron menores porcentajes que los NTg, igualándose a los 15 meses de edad (Fig. 37).

En cuanto a las células que expresan CD3+, las positivamente marcadas para **CD4**, específico de linfocitos T CD4 o colaboradores (Th), ambos grupos experimentales presentaron un aumento en su porcentaje a los 6 meses, y una disminución desde esta edad hasta los 15 meses. A los 12 meses de edad, los 3xTgAD presentaron una tendencia ( $P=0,067$ ) hacia niveles menores que los NTg. En el porcentaje de las células **CD4+CD25+**, tanto los NTg como los 3xTgAD mostraron un aumento a los 4 meses, y posteriormente a los 12 meses sólo en los NTg, lo que dio lugar a mostrar una tendencia ( $P=0,074$ ) hacia niveles menores en los 3xTgAD con respecto a los NTg a los 12 meses. En cuanto a los linfocitos T CD4 que expresan **CD45RA+**, antígeno específico de células *naïve*, se observó una disminución en el porcentaje de dichas células a los 4 meses en relación a los 2 meses en ambos grupos experimentales, disminución que fue parcialmente revertida a los 6 meses especialmente en el caso de los NTg, siendo menor ( $P=0,065$ ) en los 3xTgAD a esta edad. A los 15 meses de edad, tanto los 3xTgAD como los NTg presentaron de nuevo un bajo porcentaje de este tipo celular.

El porcentaje de leucocitos que expresan CD3+ y **CD8+**, fundamentalmente linfocitos T citotóxicos, fue mayor a los 4 y especialmente a los 12 meses ( $P=0,068$ ) en los NTg en relación a los 3xTgAD. El porcentaje de **CD8+CD25+** disminuyó a los 4 meses con respecto a los 2 meses, especialmente en los 3xTgAD, manifestando un ligero aumento a partir de esa edad. Finalmente, la expresión de **CD45RA** en linfocitos T citotóxicos mostró una disminución progresiva con la edad en el caso de los ratones NTg, mientras que en los 3xTgAD fue aumentando, a excepción de los animales de 15 meses. A los 2 meses de edad, los 3xTgAD presentaron unos niveles menores ( $P\leq 0,05$ ) que los NTg.

**Tabla XXIX.** Expresión de antígenos de diferenciación leucocitaria CD3+, CD4+, CD4+CD25+, CD4+CD45RA+, CD8+, CD8+CD25+ y CD8+CD45RA+ (%) en leucocitos peritoneales procedentes de ratones 3xTgAD y sus respectivos controles NTg.

		2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
% CD3+	NTg	15,09±4,03	25,31±5,30	35,20±3,11	19,51±0,49	14,84±2,90
	3xTgAD	22,73±1,84	13,56±0,49	28,50±0,07	12,81±2,33	16,55±0,92
% CD4+	NTg	7,78±2,47	14,67±3,75	23,20±3,46	11,50±0,64	12,53±2,12
	3xTgAD	10,05±2,40	8,39±1,13	25,33±1,48	8,68±0,42	12,59±0,99
% CD4+CD25+	NTg	8,29±1,41	12,28±1,27	5,92±0,78	17,61±0,71	13,18±2,83
	3xTgAD	7,23±0,21	20,54±4,38	6,76±0,85	10,13±2,05	8,99±2,33
% CD4+CD45RA+	NTg	20,98±0,78	3,04±0,07	13,27±1,34	7,67±0,28	3,82±0,28
	3xTgAD	22,19±1,48	2,37±0,14	4,81±1,84	6,08±1,70	3,93±0,85
% CD8+	NTg	1,40±0,07	4,78±1,48	2,67±0,92	3,02±0,35	3,50±0,57
	3xTgAD	3,46±0,92	1,27±0,14	4,37±0,28	1,48±0,21	4,82±1,20
% CD8+CD25+	NTg	14,08±2,12	5,42±2,12	8,90±2,12	12,77±1,41	10,91±4,95
	3xTgAD	30,85±11,31	4,72±0,71	11,45±4,95	11,89±1,41	6,60±0,71
% CD8+CD45RA+	NTg	17,85±2,26	15,66±5,02	9,32±2,05	10,91±0,92	7,16±1,27
	3xTgAD	6,39±1,48*	7,02±2,47	13,05±0,28	15,57±1,13	5,48±0,07

Los datos son la media  $\pm$  el error estándar de 2 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizado por duplicado. \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en los NTg de la misma edad.

#### 4.6.3. Capacidad funcional de los leucocitos peritoneales

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en los parámetros de función analizados en macrófagos y linfocitos peritoneales de ratones 3xTgAD, así como de sus controles NTg.

##### 4.6.3.1. Capacidad funcional de macrófagos: Quimiotaxis y fagocitosis

Los resultados relativos a las funciones de macrófagos estudiados a lo largo de las distintas edades de los ratones 3xTgAD y NTg se muestran en la tabla XXX y en la figura 38. A su vez, en la tabla XXXI se expresan las diferencias estadísticas en cada una de esas funciones de macrófagos entre las distintas edades, dentro de cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas entre los dos grupos experimentales de animales a cada edad se muestran en la figura arriba mencionada (figura 38).

**Tabla XXX.** Índice de quimiotaxis (número de macrófagos en filtro), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 macrófagos) y eficacia de fagocitosis (número de macrófagos que han fagocitado/100 macrófagos), de macrófagos peritoneales procedentes de ratones NTg y 3xTgAD a lo largo de las distintas edades estudiadas, 2, 4, 6, 12 y 15 meses.

Función macrófagos	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
<b>Índice de quimiotaxis (nº macrófagos)</b>					
NTg	285±58	628±105	399±61	247±32	74±17
3xTgAD	405±66	224±48	234±37	141±30	45±6
<b>Índice de fagocitosis (nº bolas látex)</b>					
NTg	547±56	385±46	400±18	763±32	285±31
3xTgAD	483±38	236±33	334±35	629±46	227±15
<b>Eficacia de fagocitosis (%)</b>					
NTg	68±4	57±4	62±4	64±4	32±3
3xTgAD	62±4	40±4	49±3	61±3	20±2

Los datos son la media ± el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

Los índices de **quimiotaxis** de macrófagos en los animales NTg, presentaron una tendencia hacia niveles mayores a los 4 meses en relación a los 2 meses, y a partir de esta edad fueron disminuyendo progresivamente con la edad. Por el contrario, en los ratones 3xTgAD estos índices disminuyeron desde los 2 meses hasta los 15 meses de edad. Al comparar los índices de quimiotaxis entre los 3xTgAD y los NTg (Fig. 38A), estos últimos presentaron unos valores mayores a los 4, 6 y 12 meses ( $P \leq 0,01$ ,  $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,05$ , respectivamente), mientras que a los 15 meses ambos grupos experimentales mostraron valores similares. El índice de fagocitosis se encontró aumentado a los 12 meses de edad, tanto en los NTg como en los 3xTgAD en relación a las otras cuatro edades estudiadas. Las diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Fig. 38B) se apreciaron a los 4 y 12 meses de edad, siendo en ambos casos menor ( $P \leq 0,05$ ) en los 3xTgAD. En cuanto a la eficacia de fagocitosis, cabe destacar la disminución de sus valores a los 15 meses en ambos grupos experimentales. Por otro lado, a los 4, 6 y 15 meses de edad los 3xTgAD mostraron una menor eficacia fagocítica ( $P \leq 0,01$ ,  $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,01$ , respectivamente) que los NTg (Fig. 38C).

**Tabla XXXI.** Diferencias estadísticas en el índice de quimiotaxis, el índice de fagocitosis y la eficacia de fagocitosis de macrófagos peritoneales entre las distintas edades estudiadas (2, 4, 6, 12 y 15 meses) de los animales NTg y 3xTgAD.

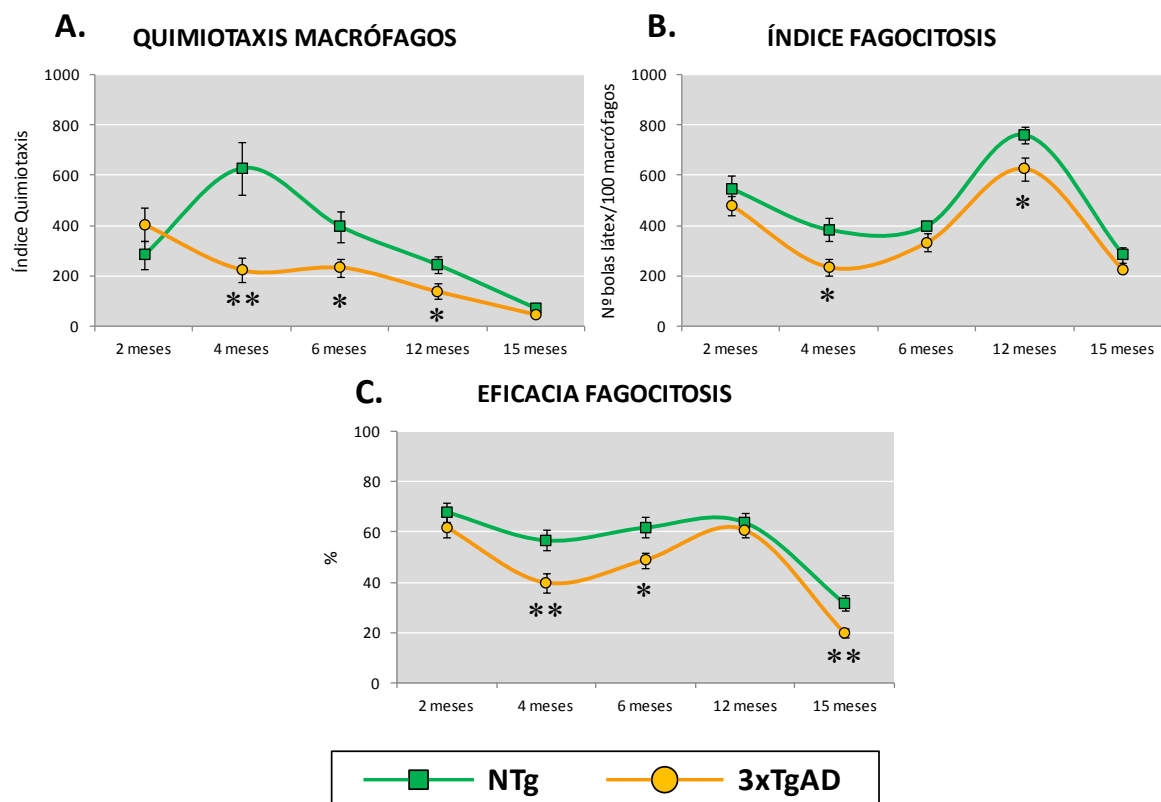
QUIMIOTAXIS MACRÓFAGOS											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	P=0,089	ns	ns	*	2 meses	-	P=0,053	P=0,067	**	***
4 meses	-	-	*	**	**	4 meses	-	-	ns	ns	**
6 meses	-	-	-	ns	**	6 meses	-	-	-	P=0,093	***
12 meses	-	-	-	-	**	12 meses	-	-	-	-	*
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

ÍNDICE DE FAGOCITOSIS											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	*	P=0,052	*	***	2 meses	-	**	*	**	***
4 meses	-	-	ns	***	**	4 meses	-	-	ns	***	ns
6 meses	-	-	-	***	**	6 meses	-	-	-	**	*
12 meses	-	-	-	-	***	12 meses	-	-	-	-	***
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

EFICACIA DE FAGOCITOSIS											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	ns	ns	ns	**	2 meses	-	*	*	ns	***
4 meses	-	-	ns	P=0,061	***	4 meses	-	-	P=0,087	**	**
6 meses	-	-	-	ns	***	6 meses	-	-	-	*	***
12 meses	-	-	-	-	***	12 meses	-	-	-	-	***
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

El símbolo “\*” hace referencia a la existencia de diferencias significativas (\*\*\* $P\leq 0,001$ , \*\* $P\leq 0,01$ , \* $P\leq 0,05$ ), el  $P$  valor definido muestra la existencia de tendencias y “ns” expresa las diferencias no significativas, entre las dos edades relacionadas por cada casilla.





**Figura 38.** Índice de quimiotaxis (número de macrófagos en filtro) (A), índice de fagocitosis (número de bolas de látex/100 macrófagos) (B) y eficacia de fagocitosis (número de macrófagos que han fagocitado/100 macrófagos) (C), de macrófagos peritoneales procedentes de ratones NTg y 3xTgAD a lo largo de las distintas edades estudiadas, 2, 4, 6, 12 y 15 meses. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en los NTg de la misma edad.

#### 4.6.3.2. Capacidad funcional de los linfocitos: Quimiotaxis, proliferación y actividad NK

Los resultados relativos a las funciones estudiadas en linfocitos a lo largo de las distintas edades de los ratones 3xTgAD y los NTg se muestran en la tabla XXXII y en la figura 39. Además, en la tabla XXXIII se expresan las diferencias estadísticas para dichas funciones al compararlas entre las distintas edades estudiadas, dentro de cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas encontradas cuando se comparan los dos grupos de animales a cada edad se muestran en la figura arriba mencionada (figura 39).

**Tabla XXXII.** Índice de quimiotaxis (número de linfocitos en filtro), proliferación (cuentas por minuto) no estimulada (basal), estimulada con concanavalina A (ConA) y con lipopolisacárido (LPS), y la actividad *Natural Killer* (% lisis de células tumorales) de linfocitos peritoneales procedentes de animales NTg y 3xTgAD a lo largo de las distintas edades estudiadas, 2, 4, 6, 12 y 15 meses.

Función linfocitos	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
<b>Índice de quimiotaxis (nº linfocitos)</b>					
NTg	527±102	841±146	720±133	312±32	136±20
3xTgAD	300±48	367±72	433±63	264±33	179±25
<b>Proliferación (cuentas por minuto)</b>					
- Basal					
NTg	4331±673	1211±218	1840±123	5125±609	3140±397
3xTgAD	6196±824	2900±832	3027±327	5852±523	4366±802
- En respuesta a ConA					
NTg	6073±822	2036±222	1103±136	3735±885	2585±377
3xTgAD	9530±1598	6907±864	6186±1212	7974±1168	12286±2280
- En respuesta a LPS					
NTg	7267±1182	2370±410	2964±245	14765±1603	5685±911
3xTgAD	7067±1062	3542±770	5413±810	13577±965	11194±1321
<b>Actividad <i>Natural Killer</i> (% lisis)</b>					
NTg	43±3	45±4	26±2	18±3	19±3
3xTgAD	33±3	31±5	19±3	16±2	17±2

Los datos son la media ± el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado.

En los índices de **quimiotaxis** (Fig. 39A) se observó una disminución muy significativa ( $P \leq 0,01$ ) a partir de la edad de 12 meses en los NTg, mientras que en los 3xTgAD dicha disminución fue menos patente al partir de valores menores. Los ratones 3xTgAD a los 2, 4 y 6 meses mostraron una menor quimiotaxis ( $P=0,065$ ,  $P \leq 0,05$  y  $P=0,072$ , respectivamente) que los NTg a esas mismas edades. En cuanto a la **proliferación en ausencia de estímulo (basal)** y **en presencia del mitógeno LPS** (Fig. 39B y 39D, respectivamente), cabe destacar el marcado aumento a los 12 meses tanto en los NTg como en los 3xTgAD con respecto a las otras edades. Los animales 3xTgAD presentaron una mayor proliferación basal en todas las edades estudiadas en relación a los NTg, siendo estadísticamente significativo a la edad de 6 meses ( $P \leq 0,01$ ) y mostrando una tendencia a los 4 meses ( $P=0,077$ ). En el caso de la proliferación en presencia de LPS (Fig. 39D) a la edad de 6 y 15 meses se apreció unos mayores niveles ( $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,01$ , respectivamente) en los 3xTgAD que en los NTg. La proliferación estimulada **con el mitógeno ConA** (Fig. 39C), fue mayor también en los 3xTgAD a la edad de 4 ( $P \leq 0,001$ ), 6 ( $P \leq 0,01$ ), 12 ( $P \leq 0,01$ ) y 15 ( $P \leq 0,01$ ) meses en relación a los NTg, mostrando una tendencia a los 2 meses ( $P=0,075$ ).

**Tabla XXXIII.** Diferencias estadísticas en el índice de quimiotaxis, la proliferación basal, en presencia de ConA y LPS, y la actividad NK de linfocitos peritoneales entre las distintas edades estudiadas (2, 4, 6, 12 y 15 meses) de los animales NTg y 3xTgAD.

QUIMIOTAXIS LINFOCITOS											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	ns	ns	P=0,077	**	2 meses	-	ns	ns	ns	*
4 meses	-	-	ns	**	**	4 meses	-	-	ns	ns	*
6 meses	-	-	-	*	**	6 meses	-	-	-	*	**
12 meses	-	-	-	-	***	12 meses	-	-	-	-	P=0,060
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

PROLIFERACIÓN BASAL											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	**	*	ns	ns	2 meses	-	*	*	ns	ns
4 meses	-	-	P=0,78	***	**	4 meses	-	-	ns	*	ns
6 meses	-	-	-	***	*	6 meses	-	-	-	***	ns
12 meses	-	-	-	-	*	12 meses	-	-	-	-	ns
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

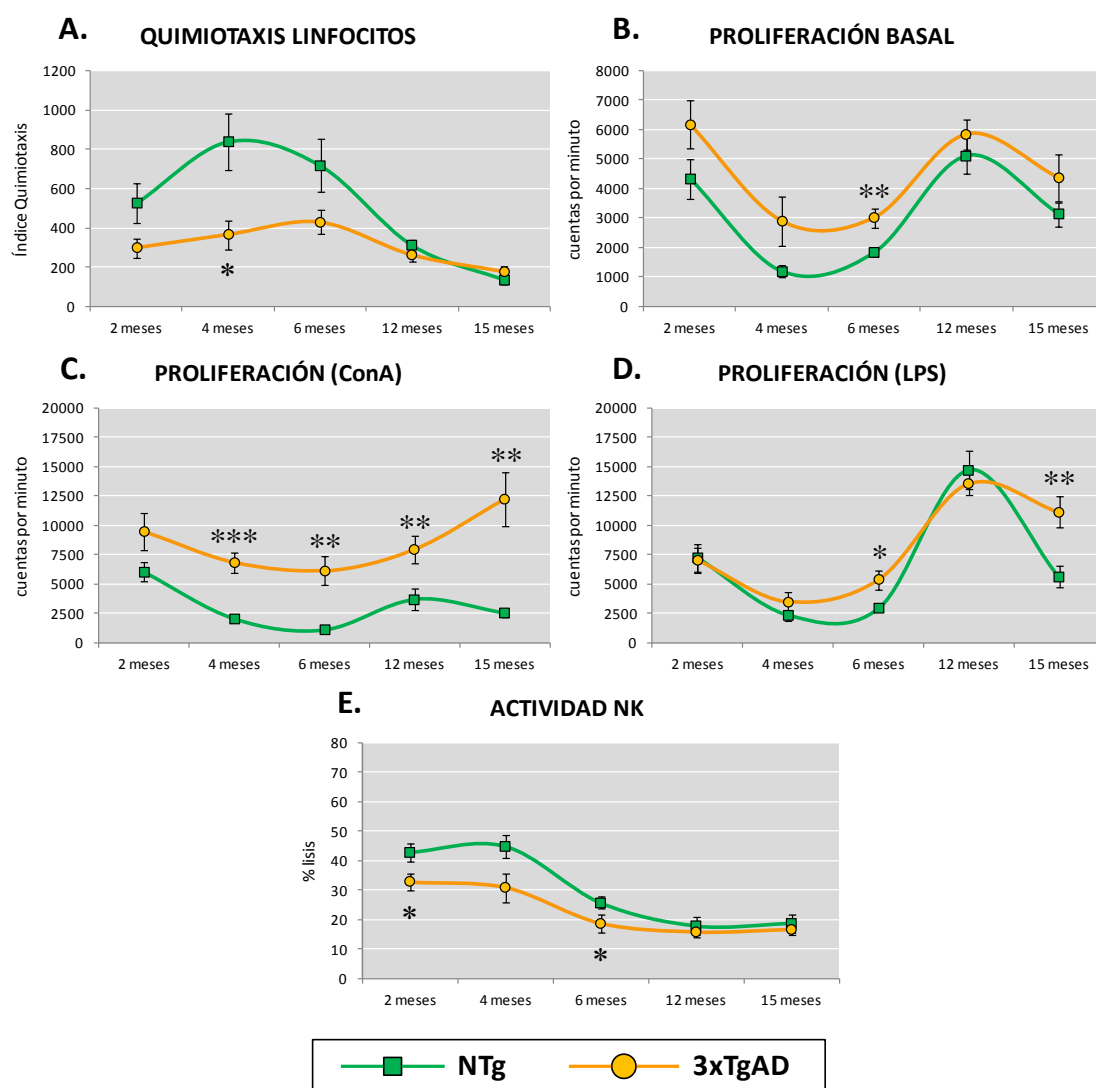
PROLIFERACIÓN EN RESPUESTA A ConA											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	**	***	P=0,094	*	2 meses	-	ns	ns	ns	ns
4 meses	-	-	**	ns	ns	4 meses	-	-	ns	ns	P=0,073
6 meses	-	-	-	*	*	6 meses	-	-	-	ns	P=0,051
12 meses	-	-	-	-	ns	12 meses	-	-	-	-	P=0,078
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

PROLIFERACIÓN EN RESPUESTA A LPS											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	**	**	**	ns	2 meses	-	**	P=0,096	**	ns
4 meses	-	-	ns	***	*	4 meses	-	-	*	***	***
6 meses	-	-	-	***	*	6 meses	-	-	-	***	**
12 meses	-	-	-	-	***	12 meses	-	-	-	-	ns
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

ACTIVIDAD NK											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	ns	***	***	***	2 meses	-	ns	**	***	***
4 meses	-	-	***	***	***	4 meses	-	-	P=0,092	*	ns
6 meses	-	-	-	ns	ns	6 meses	-	-	-	ns	ns
12 meses	-	-	-	-	ns	12 meses	-	-	-	-	ns
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

El símbolo “\*” hace referencia a la existencia de diferencias significativas (\*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$ ), el  $P$  valor definido muestra la existencia de tendencias y “ns” expresa las diferencias no significativas, entre las dos edades relacionadas por cada casilla.

Por último, en la **actividad de las células NK** (Fig. 39E), tanto los animales NTg como los 3xTgAD presentaron una disminución de dicha actividad con la edad, más acentuada en los NTg debido a que partían de valores mayores a los 2 y 4 meses. Al comparar los 3xTgAD con los NTg, se observó unos menores porcentajes de lisis en los 3xTgAD, con diferencias estadísticamente significativas a la edad de 2 y 6 meses ( $P \leq 0,05$ ) y una tendencia a los 4 meses ( $P=0,056$ ). Los valores fueron prácticamente iguales a los 12 y 15 meses.



**Figura 39.** Índice de quimiotaxis (número de linfocitos en filtro) (A), proliferación (cuentas por minuto) no estimulada (basal) (B), estimulada con concanavalina A (ConA) (C) y con lipopolisacárido (LPS) (D), y la actividad *Natural Killer* (NK) (% lisis de células tumorales) (E), de linfocitos peritoneales procedentes de los animales NTg y 3xTgAD a lo largo de las distintas edades estudiadas, 2, 4, 6, 12 y 15 meses. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de 7-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado o triplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en el grupo control NTg de la misma edad.

#### 4.6.4. Niveles de compuestos oxidantes y defensas antioxidantes

A continuación se presentan los resultados referentes a niveles de compuestos oxidantes (contenido GSSG, ratio GSSG/GSH y actividad de la xantina oxidasa) y de defensas antioxidantes (contenido GSH y actividad catalasa) en leucocitos peritoneales de ratones 3xTgAD y NTg.

##### 4.6.4.1. Oxidantes: Contenido de GSSG, cociente GSSG/GSH y actividad de la xantina oxidasa en leucocitos

Los resultados relativos al contenido de GSSG, ratio GSSG/GSH y actividad de la enzima xantina oxidasa en leucocitos peritoneales a lo largo de las distintas edades estudiadas de los ratones 3xTgAD y los NTg se muestran en la tabla XXXIV y en la figura 40. Además, en la tabla XXXV se expresan las diferencias estadísticas en dichos parámetros entre las distintas edades analizadas, dentro de cada grupo de animales. Las diferencias estadísticas al comparar los dos grupos experimentales de animales a cada edad se muestran en la figura arriba mencionada (figura 40).

**Tabla XXXIV.** Contenido de GSSG ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína), cociente GSSG/GSH y actividad xantina oxidasa ( $\text{mU.I.}/\text{mg}$  proteína) de leucocitos peritoneales procedentes de animales NTg y 3xTgAD a lo largo de las distintas edades estudiadas, 2, 4, 6, 12 y 15 meses.

Compuestos oxidantes	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
<b>GSSG (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math> proteína)</b>					
NTg	0,62 $\pm$ 0,09	0,87 $\pm$ 0,14	0,64 $\pm$ 0,11	0,68 $\pm$ 0,15	0,66 $\pm$ 0,07
3xTgAD	0,81 $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,10	0,77 $\pm$ 0,10	0,80 $\pm$ 0,08	0,66 $\pm$ 0,14
<b>Ratio GSSG/GSH (<math>\times 10^{-3}</math>)</b>					
NTg	1,34 $\pm$ 0,26	0,91 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,12	1,45 $\pm$ 0,24	3,33 $\pm$ 0,66
3xTgAD	3,67 $\pm$ 0,38	2,44 $\pm$ 0,58	2,28 $\pm$ 0,46	2,30 $\pm$ 0,28	3,20 $\pm$ 0,47
<b>Actividad xantina oxidasa (<math>\text{mU.I.}/\text{mg}</math> proteína)</b>					
NTg	3,52 $\pm$ 0,47	0,58 $\pm$ 0,19	1,03 $\pm$ 0,34	1,87 $\pm$ 0,49	2,06 $\pm$ 0,67
3xTgAD	3,06 $\pm$ 1,29	2,70 $\pm$ 0,82	2,46 $\pm$ 0,49	4,30 $\pm$ 0,99	4,98 $\pm$ 0,98

Los datos son la media  $\pm$  el error estándar de 5-9 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

El **contenido de GSSG** en los leucocitos peritoneales de ratones 3xTgAD y NTg no presentó diferencias significativas ni con la edad ni entre ambos grupos de animales. Se observó un aumento ( $P \leq 0,01$ ) en el **ratio GSSG/GSH** a los 15 meses con respecto a los 6

meses en los NTg. Los 3xTgAD en comparación con los NTg, mostraron unos niveles mayores a lo largo de las edades estudiadas (2 meses,  $P \leq 0,001$ ; 4 meses,  $P = 0,056$ ; 6 meses,  $P \leq 0,05$ ; 12 meses,  $P \leq 0,05$ ), igualando sus valores a los 15 meses (Fig. 40A). En cuanto a la **actividad de la xantina oxidasa**, en los NTg no se apreció cambios significativos con la edad, mientras que los 3xTgAD presentaron un aumento ( $P \leq 0,05$ ) a los 15 meses en relación a los 4 meses. Los 3xTgAD mostraron una actividad mayor de la xantina oxidasa que los NTg a la edad de 4, 6, 12 y 15 meses ( $P \leq 0,05$ ,  $P = 0,054$ ,  $P \leq 0,05$  y  $P \leq 0,05$ , respectivamente) (Fig. 40B).

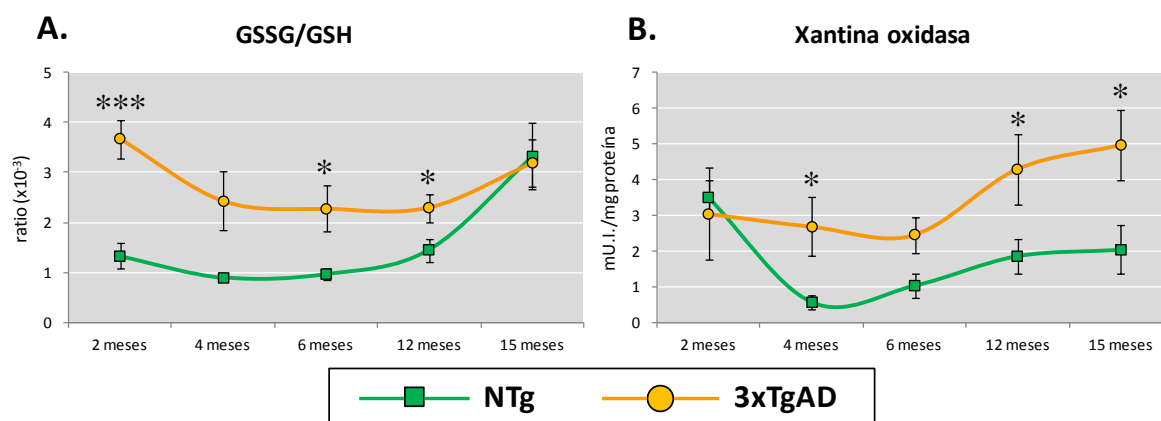
**Tabla XXXV.** Diferencias estadísticas en el contenido de GSSG, ratio GSSG/GSH y actividad de xantina oxidasa de leucocitos peritoneales entre las distintas edades estudiadas (2, 4, 6, 12 y 15 meses) de los animales NTg y 3xTgAD.

GSSG											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	ns	ns	ns	ns	2 meses	-	ns	ns	ns	ns
4 meses	-	-	ns	ns	ns	4 meses	-	-	ns	ns	ns
6 meses	-	-	-	ns	ns	6 meses	-	-	-	ns	ns
12 meses	-	-	-	-	ns	12 meses	-	-	-	-	ns
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

RATIO GSSG/GSH											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	ns	ns	ns	ns	2 meses	-	*	ns	*	ns
4 meses	-	-	ns	ns	ns	4 meses	-	-	ns	ns	*
6 meses	-	-	-	P=0,098	**	6 meses	-	-	-	ns	P=0,09
12 meses	-	-	-	-	P=0,083	12 meses	-	-	-	-	ns
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

ACTIVIDAD XANTINA OXIDASA											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	ns	ns	ns	ns	2 meses	-	ns	ns	ns	ns
4 meses	-	-	ns	ns	ns	4 meses	-	-	ns	ns	*
6 meses	-	-	-	ns	ns	6 meses	-	-	-	ns	P=0,09
12 meses	-	-	-	-	ns	12 meses	-	-	-	-	ns
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

El símbolo “\*” hace referencia a la existencia de diferencias significativas (\*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$ ), el  $P$  valor definido muestra la existencia de tendencias y “ns” expresa las diferencias no significativas, entre las dos edades relacionadas por cada casilla.



**Figura 40.** Cociente GSSG/GSH (A) y actividad xantina oxidasa (mU.I./mg proteína) (B) de leucocitos peritoneales procedentes de los animales NTg y 3xTgAD a lo largo de las distintas edades estudiadas, 2, 4, 6, 12 y 15 meses. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de 5-9 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en los NTg de la misma edad.

#### 4.6.4.2. Defensas antioxidantes: Contenido de GSH y actividad de la catalasa en leucocitos

Los resultados correspondientes al contenido de GSH y a la actividad de la catalasa en leucocitos peritoneales a lo largo de las distintas edades estudiadas de los ratones 3xTgAD y los NTg se muestran en la tabla XXXVI y en la figura 41. Además, en la tabla XXXVII se expresan las diferencias estadísticas en dichos parámetros entre las distintas edades analizadas para cada grupo de ratones. Las diferencias estadísticas al comparar los dos grupos de animales a cada edad se muestran en la figura arriba mencionada (figura 41).

**Tabla XXXVI.** Contenido de GSH ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) y actividad catalasa (U.I./ $10^6$  células) de leucocitos peritoneales procedentes de animales NTg y 3xTgAD a lo largo de las distintas edades estudiadas, 2, 4, 6, 12 y 15 meses.

Defensas antioxidantes	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
<b>GSH (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math> proteína)</b>					
NTg	508 $\pm$ 84	954 $\pm$ 130	644 $\pm$ 48	515 $\pm$ 103	243 $\pm$ 50
3xTgAD	236 $\pm$ 26	394 $\pm$ 100	387 $\pm$ 58	395 $\pm$ 65	216 $\pm$ 34
<b>Catalasa (U.I./<math>10^6</math> células)</b>					
NTg	27 $\pm$ 4	27 $\pm$ 5	31 $\pm$ 3	31 $\pm$ 3	21 $\pm$ 2
3xTgAD	27 $\pm$ 4	25 $\pm$ 3	23 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2	28 $\pm$ 3

Los datos son la media  $\pm$  el error estándar de 5-10 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado.

**Tabla XXXVII.** Diferencias estadísticas en el contenido de GSH y actividad de catalasa de leucocitos peritoneales entre las distintas edades estudiadas (2, 4, 6, 12 y 15 meses) de los animales NTg y 3xTgAD.

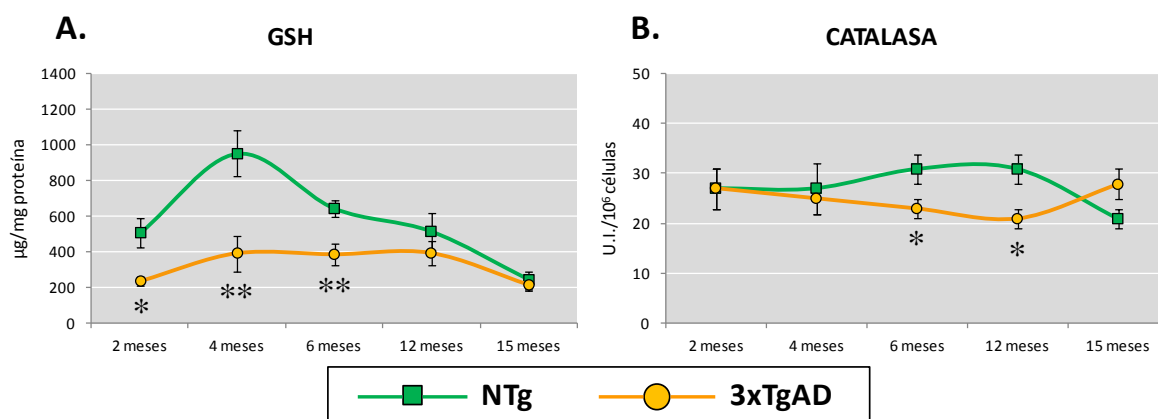
GSH											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	*	ns	ns	ns	2 meses	-	ns	ns	P=0,080	ns
4 meses	-	-	ns	ns	*	4 meses	-	-	ns	ns	ns
6 meses	-	-	-	ns	*	6 meses	-	-	-	ns	P=0,075
12 meses	-	-	-	-	P=0,072	12 meses	-	-	-	-	ns
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

CATALASA											
NTg	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses	3xTgAD	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	15 meses
2 meses	-	ns	ns	ns	ns	2 meses	-	ns	ns	ns	ns
4 meses	-	-	ns	ns	ns	4 meses	-	-	ns	ns	ns
6 meses	-	-	-	ns	*	6 meses	-	-	-	ns	ns
12 meses	-	-	-	-	*	12 meses	-	-	-	-	ns
15 meses	-	-	-	-	-	15 meses	-	-	-	-	-

El símbolo “\*” hace referencia a la existencia de diferencias significativas ( $*P\leq 0,05$ ), el  $P$  valor definido muestra la existencia de tendencias y “ns” expresa las diferencias no significativas, entre las dos edades relacionadas por cada casilla.

En el **contenido de GSH** en los ratones NTg (Fig. 41A) se observó un aumento ( $P\leq 0,05$ ) a los 4 meses de edad con respecto a los 2 meses, y seguidamente una disminución progresiva hasta los 15 meses, siendo significativa dicha disminución en relación a los 4 y 6 meses ( $P\leq 0,05$ ). Por el contrario, los animales 3xTgAD no mostraron, salvo alguna tendencia, diferencias significativas a lo largo de la edad. Los 3xTgAD presentaron unos niveles menores que los NTg a la edad de 2, 4 y 6 meses ( $P\leq 0,05$ ,  $P\leq 0,01$  y  $P\leq 0,01$ , respectivamente). La **actividad de la catalasa** disminuyó ( $P\leq 0,05$ ) en los NTg a los 15 meses en comparación con los 6 y 12 meses, mientras que en los 3xTgAD no se apreció cambios significativos con la edad. Al comparar los 3xTgAD y los NTg, a la edad de 6 y 12 meses la actividad fue menor ( $P\leq 0,05$ ) en los 3xTgAD (Fig. 41B).



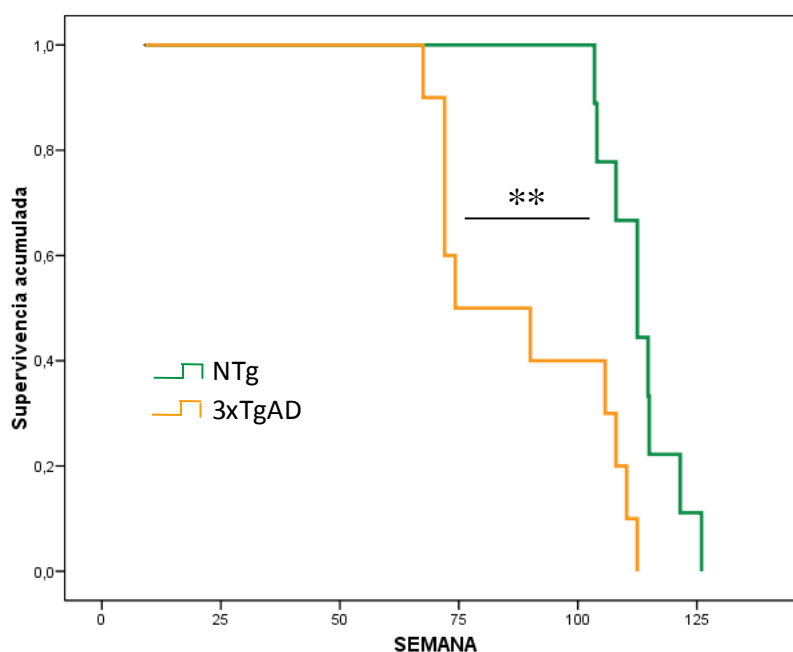


**Figura 41.** Contenido de GSH (µg/mg proteína) (A) y actividad de la catalasa (U.I./10<sup>6</sup> células) (B) de leucocitos peritoneales procedentes de los animales NTg y 3xTgAD a lo largo de las distintas edades estudiadas, 2, 4, 6, 12 y 15 meses. Cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de 5-10 valores correspondientes a ese mismo número de sujetos y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $P \leq 0,01$ , \* $P \leq 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en los NTg de la misma edad.

#### 4.6.5. Esperanza de vida media

En la figura 42 se representa la supervivencia de los ratones 3xTgAD y sus controles NTg.

El test de *Kaplan-Meier* reveló que los animales 3xTgAD tuvieron una esperanza de vida media menor ( $P \leq 0,01$ ) que los NTg.



**Figura 42.** Supervivencia acumulada (semanas) de ratones 3xTgAD y NTg. Cada línea representa la supervivencia acumulada de los animales de cada grupo experimental (10 3xTgAD; 9 NTg). Se observa una menor ( $P \leq 0,01$ ) longevidad media en los animales 3xTgAD en relación a los NTg.

# Discusión



### 5.1. ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO DEL SISTEMA INMUNITARIO. CAMBIOS CON LA EDAD EN LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EN PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y OXIDACIÓN

El aumento significativo en la población de personas mayores, característica común de los países desarrollados, plantea nuevos retos a los sistemas de salud. Concretamente en España, se estima que en el año 2030 un 25,7% de la población será mayor de 64 años y seguirá creciendo hasta mediados de siglo (extraído del Instituto Nacional de Estadística), lo que supondrá un aumento de la demanda en los recursos socio-sanitarios y económicos cada vez mayor. Esto hace necesario profundizar en el conocimiento de aquellos procesos que se encuentran implicados en el envejecimiento, con el fin de paliar, e incluso frenar, los aspectos negativos que inherentemente conlleva el paso del tiempo.

En este sentido, el sistema inmunitario, clave en el mantenimiento de la homeostasis corporal, se va deteriorando con la edad (inmunosenescencia), lo que da lugar a un aumento en la susceptibilidad y en la severidad de procesos infecciosos, autoinmunes y cancerígenos que, consecuentemente, van apareciendo (Yancik y Ries, 1991; Hirokawa *et al.*, 1992; Perskin y Cronstein, 1992; Pawelec *et al.*, 1995). Por tanto, un conocimiento más profundo en las bases de las alteraciones que ocurren en el sistema inmunitario con la edad, permitiría diseñar estrategias de actuación para enlentecer la inmunosenescencia y conseguir una calidad de vida mejor.

Los resultados que hay actualmente sobre inmunosenescencia son muy controvertidos, especialmente en aquellos que tratan los cambios que competen a la inmunidad innata ya los niveles de citoquinas con la edad. Además, si bien los datos bibliográficos sobre las variaciones del estado oxidativo con el envejecimiento fisiológico describen, en general, un mismo patrón, donde se ha observado un aumento de la oxidación y una disminución de las defensas antioxidantes, las células inmunitarias no han sido completamente caracterizadas en este sentido.

En la presente tesis, se han caracterizado toda una serie de parámetros relacionados con la función inmunitaria, previamente establecidos como indicadores de salud y longevidad, y propuestos como marcadores edad biológica (Guayerbas *et al.*, 2002a; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Puerto *et al.*, 2005; Viveros *et al.*, 2007; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; De la Fuente, 2008; De la Fuente y Miquel, 2009; Arranz *et al.*, 2010a; De la

Fuente, 2014; Mate *et al.*, 2014a), en leucocitos de sangre periférica a lo largo del envejecimiento de una amplia población de hombres y mujeres. Además, se han analizado los niveles de compuestos pro- y anti-inflamatorios, así como una serie de parámetros relacionados con el estrés oxidativo, los cuales se han valorado tanto en células sanguíneas, como en plasma de la población mencionada.

### 5.1.1. Cambios con la edad en la funcionalidad de los leucocitos de sangre periférica

En lo que respecta a los parámetros funcionales de las células inmunitarias, analizados en la presente tesis, los datos obtenidos en los **índices de adherencia** de **neutrófilos** y de **linfocitos**, muestran un aumento de esta función en los sujetos del grupo de maduros (60-79 años de edad), tanto en hombres como en mujeres. Resultados similares han sido descritos por nuestro grupo en estudios previos y por otros grupos de investigación en neutrófilos (Damtew *et al.*, 1990; De la Fuente *et al.*, 2008; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008) y en linfocitos (McArthur, 1998; Hirokawa, 1999; De la Fuente y Victor, 2000; De la Fuente *et al.*, 2008) de sangre periférica humana. Cabe destacar que, mientras que en los neutrófilos dicho aumento tiene lugar de manera drástica en el grupo de edad señalado, elevación de una gran significación estadística en relación a las otras edades, en los linfocitos ocurre de manera paulatina a lo largo del envejecimiento de los individuos. Estos niveles mayores podrían deberse al aumento en la expresión de algunas moléculas de adhesión en la superficie de las células leucocitarias, como las integrinas, CD11a y LFA-1 entre otras, que si bien son proteínas de membrana esenciales en la interacción célula-matriz extracelular y célula-célula, niveles demasiado elevados de las mismas podrían resultar en una aumentada capacidad de los neutrófilos y los linfocitos para adherirse (Ginaldi *et al.*, 1999). Esta modulación a la alza en la expresión de moléculas de adhesión se podría interpretar como un esfuerzo de las células inmunitarias para hacer frente a la disminuida capacidad de respuesta a un estímulo de las personas mayores, o debido a la necesidad de mayores niveles de señales de activación (Ginaldi *et al.*, 1999). Además, son muchos los estudios que sugieren una estrecha relación entre los niveles de las moléculas de adhesión y la oxidación, ya que factores de transcripción tales como la proteína activadora 1 (AP-1, del inglés *activator protein-1*) y el NF- $\kappa$ B, implicados en la expresión de dichas moléculas, son activados por el estrés oxidativo, por lo que el aumento de estas moléculas de adhesión con la edad

podría estar reflejando los efectos acumulativos del estrés oxidativo crónico que tiene lugar con el envejecimiento (Hirokawa, 1999; Miles *et al.*, 2001).

En cuanto a la **capacidad de quimiotaxis** de los **neutrófilos** y los **linfocitos**, los resultados muestran una disminución de sus niveles a lo largo de las edades estudiadas, tanto en hombres como en mujeres en los neutrófilos, y especialmente en las mujeres en el caso de los linfocitos. Cabe destacar que, al analizar sólo el factor *género*, los hombres presentan unos niveles de quimiotaxis de neutrófilos mayores que las mujeres. La disminución en la capacidad quimiotáctica con la edad, descrita también por diversos autores en neutrófilos (Niwa *et al.*, 1989; Di Lorenzo *et al.*, 1999; Fulop *et al.*, 2004; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008) y en linfocitos (Arranz *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011), afectaría al tiempo que necesitan las células para alcanzar el foco de la infección, y por lo tanto, permitiría que el microorganismo se dividiera y expandiera más fácilmente, estableciéndose la infección. Así, en el caso de los neutrófilos, los individuos mayores, al realizar un reclutamiento defectuoso de los mismos, mostrarían un retardo en la eliminación de los patógenos y en la curación de las heridas, como se ha observado en ratón, donde a pesar de mantener unos niveles similares de quimioquinas (CXCL1, MIP-2 y MCP-1) en sujetos jóvenes y viejos, estos últimos muestran una menor quimiotaxis, afectando la dinámica de la fase inflamatoria de la curación de las heridas. Esto podría explicar la elevada tasa de dehiscencia y cronicidad de las heridas en personas mayores (Brubaker *et al.*, 2013). En el caso de los linfocitos, el deterioro de su movilidad con la edad constituiría un proceso crítico, ya que la iniciación de la respuesta inmunitaria depende de la movilidad de los linfocitos, esencial para la inmunovigilancia y el reconocimiento antigénico (Janeway y Goldstein 1991). Además, la producción del factor de inhibición migratoria de macrófagos (MIF), proteína que inhibe la quimiotaxis, se encuentra inducida en situaciones de estrés oxidativo (Calandra y Bucala, 1997), lo que también podría estar ocurriendo con el envejecimiento.

Por otro lado, cuando los leucocitos fueron expuestos a un ambiente carente de gradiente quimiotáctico, éstos, tanto los **neutrófilos** como los **linfocitos**, muestran un aumento en su **movilidad espontánea** con la edad, especialmente en mujeres mayores de 60 años. De hecho, recientemente se ha descrito que, a edades mayores, especialmente a partir de los 60 años de edad, aparece una migración imprecisa y aberrante de los

neutrófilos de sangre periférica (Sapey *et al.*, 2014). Estos autores indican que la menor precisión en la migración de los neutrófilos estaría asociado a la actividad de fosfoinositol 3-kinasa (PI3K) constitutiva, enzima central en los procesos de locomoción de los neutrófilos, obteniendo una reversión de la migración defectuosa al inhibir dicha enzima. Además, una migración ineficiente aumentaría el daño tisular, ya que los neutrófilos, con el fin de facilitar su migración a través de los tejidos, secretan proteasas como la elastasa. Esto extendería la inflamación y afectaría la resolución de la misma en las personas mayores (Shaw *et al.*, 2010).

En lo que respecta a la **fagocitosis** de agentes extraños, en términos de índice y eficacia, los neutrófilos presentan una disminución de ambos parámetros con la edad tanto en hombres como en mujeres; ya a partir de los 50 años de edad en el **índice fagocítico**, y a partir de los 60 en el caso de la **eficacia fagocítica**. Esto estaría indicando que los neutrófilos, ya a edades de unos 50 años comenzarían a perder la capacidad de fagocitar, y que a partir de los 60 años habría más células incapaces de ingerir siquiera una sola partícula extraña. Esta menor capacidad en la fagocitosis, previamente ya descrita con el envejecimiento (Butcher *et al.*, 2001; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008; Simell *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2014), parece deberse, al menos en parte, a una reducción de la expresión en la superficie de los neutrófilos del receptor Fcγ CD16 que media la activación de estas células y su capacidad de fagocitar, lo que afectaría a su funcionalidad. De hecho, se ha propuesto que esta pérdida en la expresión de CD16 podría ser el principal responsable del deterioro funcional de los neutrófilos con la edad, así como del aumento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas en las personas mayores (Butcher *et al.*, 2001). Además, se ha comprobado que aquellas personas de 85 o más años de edad que poseen bajos niveles del receptor CD16, tienen tres veces más probabilidad de fallecer por cualquier causa en los dos primeros años desde el inicio de su seguimiento, en comparación con aquellas que muestran niveles altos de CD16 (Pawelec *et al.*, 1998). En cuanto a otros receptores que median la activación de los neutrófilos, no se han encontrado cambios en su expresión asociados a la edad (Butcher *et al.*, 2001). Sin embargo, un amplio número de cascadas de señalización que emplean estos receptores, sí se encuentran afectadas con la edad, como las del transporte del calcio, la PI3K, la de MAP quinasas (MAPK), la de proteína-quinasa B, Jak-STAT y SHP-1 (Wessels *et al.*, 2010). Esto sugiere que los procesos de señalización genérica mencionados

puedan estar en la base de la alteración funcional que experimentan los neutrófilos al envejecer (Shaw *et al.*, 2010). Además, los cambios en la composición de los lípidos de membrana con la edad son cruciales para la estructura de las balsas lipídicas, las cuales son indispensables para el correcto funcionamiento de muchos receptores de membrana. Por ejemplo, la disminución del colesterol compromete la señalización mediada por los receptores y podrían explicar los múltiples cambios en dicha señalización que experimentan los neutrófilos con la edad (Shaw *et al.*, 2010). Por otro lado, las defensas antioxidantes intracelulares son de vital importancia para el mantenimiento de una adecuada función de los leucocitos. Así, la disminución del contenido antioxidante asociada al envejecimiento podría dar lugar a una fagocitosis defectiva (Hernanz *et al.*, 1990; Arranz *et al.*, 2008).

En cuanto a los niveles de **anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )** analizados en los neutrófilos tanto *en condiciones basales* como *estimuladas*, los resultados muestran un aumento de los mismos en ambas situaciones, ya a partir de los 50 años de edad en el caso de los hombres, y especialmente a partir de la década de los 60 en ambos sexos. Sin embargo, cuando estudiamos el *porcentaje de estimulación* de este anión, mediante la relación entre ambas condiciones, los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  disminuyen con el envejecimiento, especialmente en hombres mayores de 60 años. Otros trabajos también hacen referencia a un aumento en los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  de neutrófilos con el envejecimiento (De la Fuente *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008; Alonso-Fernández *et al.*, 2008), sin embargo, no muestran la relación entre ambas condiciones, que es lo que indica claramente la capacidad de producción “real” de  $O_2^{\cdot-}$  en presencia de un estímulo. El aumento de  $O_2^{\cdot-}$  observado en la presente tesis y en los trabajos arriba mencionados, podría deberse al mayor estado de oxidación de los neutrófilos consecuencia del envejecimiento (Siomek *et al.*, 2007; Alonso-Fernández *et al.*, 2008), especialmente en condiciones basales. Al considerar la relación entre los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  en condiciones de estimulación *versus* estado basal, el porcentaje nos indica la disposición de este radical libre con fines microbicidas. La disminución de esta capacidad microbicida con la edad podría deberse, a cambios en la composición de las membranas (Perskin y Cronstein, 1992). El aumento de la fluidez de las membranas con la edad reduciría el reclutamiento de receptores de activación a las balsas lipídicas, comprometiendo un gran número de vías de señalización claves para los mecanismos microbicidas (Shaw *et al.*, 2010), y por tanto aumentando la vulnerabilidad a infecciones en las personas mayores (Perskin y Cronstein,



1992). Además, se ha descrito una menor actividad de las enzimas que forman parte del estallido respiratorio (Sharma *et al.*, 2014), lo que conduciría a una menor producción de las ROS necesarias para la destrucción del material fagocitado.

La **actividad citotóxica**, una de las funciones clave de las células NK, disminuye con el envejecimiento, ya a partir de los 50 años en los hombres, y especialmente a partir de los 60 años en ambos sexos. Otros investigadores también han descrito una disminución de dicho parámetro en la vejez, al analizarlo por célula (Mariani *et al.*, 1996; Di Lorenzo *et al.*, 1999; Solana y Mariani, 2000; Arranz *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008). La disminución en la expresión de receptores de activación, como NKp30 y NKp46, llamados receptores de citotoxicidad natural (NCRs, del inglés *Natural Cytotoxicity Receptors*) e implicados en el reconocimiento y la eliminación de las células diana, puede ser responsable de la disminuida citotoxicidad de las células NK observada en las personas mayores (Almeida-Oliveira *et al.*, 2011). Además, la alteración en diversas vías de señalización, como la disminución de la vía PKC1 por una liberación defectuosa de IP3, podría ser la causa de una citotoxicidad defectiva con el envejecimiento (Mariani *et al.*, 1998). Además, los disminuidos niveles de zinc en el suero de las personas mayores (Maes *et al.*, 1999), cofactor esencial para una actividad óptima de las células NK, podría estar contribuyendo en la peor capacidad citotóxica de estas células. Por otro lado, el aumento en el número de las células NK con el fenotipo CD56<sup>dim</sup> en la vejez, cuya función principal sería llevar a cabo la actividad citotóxica, incremento ampliamente descrito en la bibliografía, podría representar un mecanismo para compensar la menor funcionalidad citotóxica de las mismas (Almeida-Oliveira *et al.*, 2011).

Por otro lado, la **respuesta proliferativa** de los linfocitos *en ausencia de cualquier estímulo*, no muestra cambios asociados a la edad, al igual que han descrito otros autores (Gillis *et al.*, 1981). Por el contrario, cuando son *estimulados con PHA*, la respuesta de los linfocitos disminuye con la edad, especialmente en mujeres mayores de 60 años. Si se considera la **capacidad proliferativa**, parámetro que relaciona ambas condiciones, indicando la capacidad de estímulo proliferativo por la presencia de un mitógeno en relación a la proliferación basal, se observa una marcada disminución en las mujeres a partir de los 60 años de edad, así como unos valores menores en los hombres que en las mujeres, especialmente en aquellos que se encuentran entre los 30 y 49 años de edad. Son muchos los trabajos que apoyan una pérdida de la capacidad proliferativa de los linfocitos en

respuesta a estímulos mitogénicos al avanzar la edad (Inkeles *et al.*, 1977; Gillis *et al.*, 1981; Song *et al.*, 1993; Arranz *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008). Incluso los sujetos mayores que cumplen el criterio SENIEUR muestran, también, una baja proliferación frente a PHA (Krause *et al.*, 1999). La principal base de esta pérdida de la función de los linfocitos T es la incapacidad de dichas células para responder a la activación que se transmiten a través de señales estimuladoras específicas de unión a membrana (Song *et al.*, 1993). El declive en la producción y liberación de IL-2, principal citoquina inductora de la proliferación de los linfocitos T, además de la menor densidad de su receptor (IL-2R) en las membranas de esas células, junto con unos porcentajes menores de linfocitos T IL-2R+ (Nagel *et al.*, 1988), contribuirían a la menor señalización tras la unión linfoquina-receptor en la membrana de los linfocitos. También contribuyen a este hecho las alteraciones que con la edad experimenta la red de citoquinas producidas durante la respuesta inmunitaria, pues además de la disminución de IL-2 mencionada, tiene lugar un aumento de IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12 y TGF- $\beta$  por los linfocitos T (Song *et al.*, 1993; Castle *et al.*, 1999). De hecho, ya en 1981, Gillis y colaboradores observaron que la proliferación de los linfocitos T de personas mayores de 65 años, en presencia de PHA y de IL-2 exógena, no aumentaba como ocurría en individuos jóvenes. Esto parecía apuntar a alteraciones en vías de señalización asociadas a receptores, como la disminución en la activación de ERK y de la familia de las MAPK, lo que probablemente jugaría un papel en la disminución de la linfoproliferación (Li *et al.*, 2000). Además, los cambios en la composición de las membranas podrían interferir en la unión de los ligandos a sus receptores, y como consecuencia, las células T de los sujetos mayores no serían capaces de responder a las señales de activación que se transmiten a través de la unión de los complejos antígeno/MHC al receptor de las células T (Wick y Grubeck-Loebenstein, 1997). La disminución de moléculas de coestimulación como la CD28, los cambios en el citoesqueleto, y la transcripción retardada o disminuida de varios ARNm-s, también podrían explicar esta disminuida reactividad de las células T con el envejecimiento (Wick y Grubeck-Loebenstein, 1997). Por otro lado, el marcado estrés proliferativo que sufren los linfocitos de personas mayores debido a las recurrentes expansiones clonales que han llevado a cabo (senescencia replicativa), junto con la aparición de subpoblaciones de linfocitos no funcionales apoyarían la reducción de la capacidad proliferativa de los linfocitos con la edad (Franceschi *et al.*, 2000; Sansoni *et al.*, 2008; Ongrádi y Kövesdi, 2010). De hecho, se ha propuesto que la respuesta proliferativa a la PHA y especialmente la anergia o

el estado de “latencia” de los linfocitos, que, a pesar de estar presentes, son incapaces de activarse, y que puede ser determinado por el test de hipersensibilidad cutánea retardada, son predictores de mortalidad (Wayne *et al.*, 1990).

### 5.1.2. Cambios con la edad en la liberación de citoquinas y algunos receptores solubles

Por otro lado, con el envejecimiento tiene lugar una desregulación en la red de interacciones que ejercen las **citoquinas**, las cuales parecen jugar un papel central en la remodelación del sistema inmunitario con la edad (McNerlan *et al.*, 2002).

A pesar de que son numerosas las publicaciones referentes a los niveles de citoquinas producidas durante una determinada respuesta inmunitaria frente a un estímulo *in vitro* en personas de distintas edades, con el fin de determinar la desregulación existente derivada del deterioro del sistema inmunitario con el envejecimiento, estos estudios muestran frecuentemente resultados contradictorios. El origen de la controversia en los niveles de citoquinas con la edad pueden ser varios, de los cuales cabe destacar: 1) La selección de los sujetos, ya que la mayor prevalencia de morbilidad y factores de riesgo cardiovasculares, típicas de personas mayores, pueden contribuir a un sistema inmunitario modificado (Caruso *et al.*, 2004; Ferrucci *et al.*, 2005), con la consecuente variación y heterogeneidad en los niveles de citoquinas al aumentar la edad. 2) El gran número de diseños metodológicos posibles. Este factor, probablemente, es la mayor fuente de resultados contradictorios observados en la bibliografía. La existencia en el mercado de un amplio abanico de tipos de estímulo (PHA, LPS, ConA, anti-CD3,...), las concentraciones a las que se emplean, o su tiempo de exposición a la hora de desencadenar una respuesta inmunitaria *in vitro*, imposibilita, muchas veces, contrastar los resultados de distintos trabajos experimentales. Además, existen muchos tipos de muestras biológicas donde se pueden valorar citoquinas; los sobrenadantes de cultivo tras una estimulación *in vitro*, comúnmente muy empleados, permiten valorar la producción y/o liberación de las citoquinas procedentes de los leucocitos que se hayan cultivado. Estas células pueden ser de distintos orígenes, sangre periférica, peritoneo, timo, bazo,... Además, pueden ser cultivadas sin realizar ningún tipo de aislamiento previo, como por ejemplo el uso de sangre completa, permitiendo que las células se encuentren en su ambiente fisiológico “normal” o “real”, o tras un proceso de separación, donde se purificaría el tipo leucocitario deseado, linfocitos, células

mononucleares de sangre periférica (PBMCs), macrófagos o neutrófilos, del entorno celular donde se encuentren. Así, en función de la procedencia y el tipo de leucocito presente en el cultivo, el estímulo y el protocolo empleado, el resultado podría variar significativamente. Además, cabe destacar que el aislamiento celular condicionará el efecto de la producción de una citoquina concreta por una célula determinada y por tanto la respuesta inmunitaria, debido a la presencia/ausencia de otra(s) célula(s) que pudiera(n) cooperar en la generación de esa determinada citoquina. Por otro lado, la valoración de citoquinas intracelulares, técnica desarrollada durante la última década mediante el uso del citómetro de flujo, permite discernir qué citoquina y en qué cantidades está siendo producida por un tipo de leucocito concreto previamente marcado; si bien esa producción no representa la cantidad de citoquina que pueda ser liberada al medio, y por lo tanto, la que efectuaría su acción. 3) La técnica empleada para la detección de las citoquinas. El uso de una técnica u otra, como por ejemplo ELISA, RIA, o citometría de flujo, condicionará el valor, en términos de concentración, de la citoquina presente en la muestra, e incluso podrá determinar su detección o no, en función de la sensibilidad del procedimiento seleccionado.

En la presente tesis, los tipos de muestra de sangre periférica empleados para la detección de citoquinas han sido: 1) El sobrenadante de células mononucleares cultivadas durante 48 horas en presencia de PHA, 2) el plasma procedente de sangre completa estimulada previamente con LPS durante 4 horas, y 3) el plasma (apartado 5.1.3.).

### ***Valoración de citoquinas en el sobrenadante de células mononucleares estimuladas con PHA***

Con respecto a los niveles de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica o PBMCs realizada tras una estimulación de 48 h con PHA, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una disminución de los niveles de **IL-2** a partir de la década de los 50 años, la cual se mantiene en el grupo de individuos de 60-79 años, tanto en hombres como en mujeres. Prácticamente todos los trabajos encontrados en la bibliografía indican que existe una menor producción y liberación de IL-2 por parte de los linfocitos frente a PHA con el envejecimiento (Gillis *et al.*, 1981; Nagel *et al.*, 1988; Rink *et al.*, 1998; Karanfilov *et al.*, 1999; De la Fuente *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008), y concretamente de los linfocitos T CD4+, tanto *naïve* como de memoria

(Kurashima y Utsuyama, 1997). Este hecho también se ha demostrado en los linfocitos de otras localizaciones como el timo, el bazo, los nódulos axilares y el peritoneo de roedores frente a ConA, otro mitógeno específico de linfocitos T (Dayan *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2000a; De la Fuente *et al.*, 2004a; Puerto *et al.*, 2005; Simioni *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2010b; Arranz *et al.*, 2010c). Además, el factor *género* no parece ejercer ninguna influencia sobre los niveles de IL-2, al igual que han descrito otros autores (Bruunsgaard *et al.*, 2000b). Esta citoquina es el principal factor de crecimiento de los linfocitos T, regulando, a través de la unión a su receptor de membrana, IL-2R, la activación de genes asociados a la proliferación celular, pero paradójicamente, también la muerte de los linfocitos. Por lo que, esta citoquina ha sido considerada esencial en la homeostasis de los linfocitos T (Burchill *et al.*, 2007). La disminución en el porcentaje de linfocitos T *naïve* con la edad, principales productores de IL-2, hacia porcentajes más elevados de linfocitos T de memoria, principalmente dentro del subtipo T helper (Th) 1, podría ser una de las causas, al menos en parte, de la baja producción de IL-2 con el envejecimiento (Ginaldi *et al.*, 1999). También, los bajos niveles de expresión del ARNm de IL2 y IL-2R al envejecer, lo que conduciría a una menor síntesis y secreción de IL-2 y una baja densidad de IL2R en la membrana, así como los menores porcentajes de células T IL2R+, podrían ser responsables de la baja actividad proliferativa de los linfocitos de las personas mayores (Gillis *et al.*, 1981; Nagel *et al.*, 1988; Bruunsgaard *et al.*, 2000a). Además, la respuesta de los linfocitos a IL-2 se encuentra deteriorada, ya que estas células, en personas de 67-81 años, al incubarlas con IL-2 exógena no muestran un aumento de su proliferación, hecho que sí sucede en los linfocitos de jóvenes (Gillis *et al.*, 1981), lo que estaría indicando una alteración con la edad en las vías de señalización que pone en marcha esta citoquina al unirse a su ligando. Por lo tanto, los defectos en la capacidad de producir y de responder a IL-2 podrían ser una de las causas fundamentales de la baja capacidad proliferativa de las personas mayores (Gillis *et al.*, 1981) que se ha comentado ya anteriormente.

En cuanto a los niveles de **IL-1 $\beta$** , los resultados presentan una tendencia hacia unos niveles mayores con la edad, tanto en hombres como en mujeres. Esta citoquina pleiotrópica es considerada pro-inflamatoria al ser una de las responsables claves de la respuesta inflamatoria aguda. Es la responsable de la fiebre, la neutrofilia y la producción de proteínas de fase aguda. Al ser liberada principalmente por los monocitos/macrófagos en respuesta a

TNF- $\alpha$ , ha sido poco estudiada en sobrenadantes de cultivo cuyas células hayan sido sometidas a un estímulo específico de linfocitos, como lo es la PHA. En algunos trabajos llevados a cabo con mononucleares y ese mitógeno, se apreció un aumento no significativo con la edad (Gabriel *et al.*, 2002), al igual que se ha observado en la presente tesis. Pietschmann y colaboradores (2003), al realizar su valoración intracelular en células mononucleares estimuladas con un mitógeno propio de linfocitos T, tampoco encontraron diferencias asociadas a la edad. Sin embargo, hay estudios en los que sí se encontraron unos niveles significativamente mayores en la liberación de esta citoquina en personas de 80 años (Fagiolo *et al.*, 1993).

En lo que respecta a los niveles de **IL-6** en el sobrenadante de cultivo de PBMCs frente a la estimulación con PHA, los resultados muestran una disminución progresiva y significativa a lo largo de los grupos de edades estudiados, donde los hombres aparecen con menores niveles que las mujeres, especialmente a la edad de 50-59 años y 60-79 años. Esta citoquina pleiotrópica con múltiples efectos sobre diferentes tipos de células, es un mediador temprano junto a IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  de la respuesta inmunitaria aguda, induciendo fiebre y activando linfocitos B y T (Ginaldi *et al.*, 1999). Aunque son muchas las células que la pueden generar (Pedersen *et al.*, 2001), como se mencionará más adelante, su principal productor dentro de los componentes celulares del sistema inmunitario son los monocitos/macrófagos, por lo que la mayoría de los estudios realizan su valoración en plasma o en sobrenadante de cultivo de leucocitos estimulados con LPS. En los trabajos en los que se analizan los cambios con la edad en los niveles de esta citoquina en el sobrenadante de PBMCs estimulados con PHA y otros mitógenos específicos de linfocitos T, se ha apreciado un aumento al envejecer (Fagiolo *et al.*, 1993; Beharka *et al.*, 2001). Su valoración intracelular en linfocitos T, también muestra niveles mayores al avanzar la edad (O'Mahony *et al.*, 1998), así como un mayor porcentaje de células T CD8+ positivamente marcadas para IL-6 en personas mayores (Zanni *et al.*, 2003). Además, ya en ausencia de cualquier estímulo, al avanzar la edad, las células mononucleares sobre-expresan el ARNm de IL-6 (Myśliwska *et al.*, 1998). La discrepancia en los resultados obtenidos en la presente tesis con la bibliografía, puede ser debida a diferencias en las condiciones experimentales y en la condición fisiológica de cada individuo. Cabe destacar que algunos de los estudios arriba citados emplearon otros mitógenos no estrictamente específicos de linfocitos T, como PMA e ionomicina (O'Mahony *et al.*, 1998;

Zanni *et al.*, 2003), y los que emplearon PHA, lo hicieron a concentraciones ligeramente menores (10 µg/ml frente a 12,5 µg/ml de nuestro protocolo) (Beharka *et al.*, 2001). Por otra parte, son muchos los estudios que hacen referencia a un dimorfismo sexual en los niveles de IL-6, tanto en el sobrenadante de cultivo de PBMCs como en el plasma (Giuliani *et al.*, 2001; Ferrucci *et al.*, 2005; Goetzl *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012), hecho que también se ha observado en la presente tesis y que se discutirá más adelante.

Los niveles de **TNF-α** liberados al sobrenadante de cultivos de células mononucleares estimulados con PHA disminuyen con la edad, ya a los 50-59 años de edad en los hombres, y significativamente a los 60-79 años en ambos sexos. Sin embargo, los trabajos publicados muestran una mayor liberación de TNF-α en el sobrenadante de células mononucleares no estimuladas y estimuladas con PHA, y con otros mitógenos como ConA, LPS, etc. (Fagiolo *et al.*, 1993; Myśliwska *et al.*, 1999; Saurwein-Teissl *et al.*, 2000; Arranz *et al.*, 2008) al avanzar la edad. También, se han encontrado aumentos en el sobrenadante de sangre completa estimulada con PHA (Maes *et al.*, 1999). Además, frente a ionomicina y/o PMA, se ha observado un mayor porcentaje de linfocitos T que producen TNF-α en personas mayores que en jóvenes (McNerlan *et al.*, 2002; Zanni *et al.*, 2003), y un aumento de las cantidades intracelulares de TNF-α en estas células con la edad (O'Mahony *et al.*, 1998). El que los resultados obtenidos en la presente tesis no coincidan con los referidos en la bibliografía existente podría deberse, al igual que se ha comentado para la citoquina IL-6, a diferencias en las condiciones experimentales y en la condición fisiológica de los sujetos estudiados, ambos factores especialmente determinantes de los niveles de TNF-α. Cabe destacar, la baja concentración de PHA empleada en algunos trabajos arriba citados para desencadenar la respuesta *en vitro*, incluso de más de 10 veces menor, lo que podría ser la causa de la discrepancia en los niveles de esta citoquina.

Los resultados obtenidos en los niveles de **IL-8** en los sobrenadantes de cultivo de PBMCs muestran una disminución de su liberación al avanzar la edad. Estos menores niveles son patentes ya a partir de los 50-59 años de edad sólo en los hombres, y a los 60-79 años en ambos sexos. Además, los hombres presentan unos valores significativamente inferiores a las mujeres en los tres grupos de edad estudiados, 30-49, 50-59 y 60-79 años. El principal productor de IL-8, citoquina con propiedades quimioatrayentes y esencial para la movilización, activación y degranulación de neutrófilos, es el propio neutrófilo durante la

inflamación. Por esta razón, son pocos los trabajos que presentan valoraciones de IL-8 en sobrenadantes de cultivo de células aisladas, y concretamente de PBMCs, estimulados con mitógenos específicos de linfocitos T. Gabriel y colaboradores (2002), encontraron una disminución, aunque no significativa, de los niveles de IL-8 en el sobrenadante de sangre completa en presencia de PHA durante 24 h a una concentración 2,5 veces menor a la empleada por nosotros en personas mayores que cumplían el protocolo SENIEUR en relación a sujetos jóvenes. Sin embargo, otros investigadores no observaron diferencias en los niveles de esta citoquina en el sobrenadante de células mononucleares en presencia de anti-CD3 con la edad (Pulsatelli *et al.*, 2000). En relación a las diferencias asociadas al género, otros autores también describen un dimorfismo sexual en los niveles de esta citoquina en cultivos de monocitos en ausencia/presencia de LPS, especialmente en personas de 65-79 años, siendo éstos mayores en las mujeres que en los hombres (Clark y Peterson, 1994), hecho que también se ha detectado en el presente estudio.

En cuanto a los niveles de **IL-10** en el sobrenadante de cultivo de PBMCs en presencia de PHA, no se pudo llevar a cabo su determinación, ya que al no realizar ninguna dilución previa de la muestra, la fluorescencia emitida por los fluoróforos fue superior a la curva patrón proporcionada por el kit comercial. La IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria producida por linfocitos T, B, neutrófilos y monocitos/macrófagos con una potente capacidad de inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias, así como de citoquinas reguladoras como IL-2 por los linfocitos T, lo que provoca una disminución de la capacidad proliferativa de los mismos (Howard y O'Garra, 1992; Lalani *et al.*, 1997). Los resultados publicados sobre esta citoquina analizada en el sobrenadante de cultivo de PBMCs y sangre completa, liberada en respuesta a mitógenos específicos de linfocitos T es controvertida. En la mayoría de los estudios se muestra un aumento de los niveles de esta citoquina en presencia de tales mitógenos al envejecer (Cakman *et al.*, 1996; Kurashima y Utsuyama, 1997; Castle *et al.*, 1999; Pietschmann *et al.*, 2003). No obstante, en algunos trabajos se describe una disminución de los niveles con la edad (Saurwein-Teissl *et al.*, 2000; Bruunsgaard *et al.*, 2000a). En muestras de ratón, como el bazo y el peritoneo, los resultados que presenta la bibliografía también son contradictorios, habiéndose observado niveles aumentados (Dayan *et al.*, 2000), disminuidos (Simioni *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2010c), e incluso inalterados (Murciano *et al.*, 2008) al avanzar la edad.



Son muchos los inmunogerontólogos que han apuntado a que con la edad, si bien, la capacidad de las células mononucleares de producir IL-2 disminuye, aumenta la de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Fagiolo *et al.*, 1993; Franceschi *et al.*, 1995; Rink *et al.*, 1998; Ginaldi *et al.*, 1999). Sin embargo, tal y como se ha ido detallando a lo largo de la discusión, y concretamente en aquellas partes referentes a IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8, la concentración de PHA empleada por otros investigadores para desencadenar una respuesta inmunitaria *in vitro*, ha sido hasta 12,5 veces menor que la empleada en la presente tesis. Además, varios de estos estudios llevaron a cabo periodos de incubación de 24 horas con el mitógeno, frente a las 48 horas que establece el protocolo empleado en la presente tesis. Esto llevaría a plantear la posibilidad de que el tiempo de incubación y la concentración de PHA empleados en este trabajo, si bien serían adecuados para valorar la capacidad proliferativa de los linfocitos, fueran demasiado elevados para valorar estas tres citoquinas. Se podría haber dado un agotamiento en la liberación de las mismas, el cual ocurriría antes en las personas mayores, o bien podrían haberse consumido y/o unido a sus respectivos receptores de membrana en la superficie de los leucocitos, disminuyendo sus niveles en los sobrenadantes. Sin embargo, estos resultados podrían complementar los expuestos por otros autores ya que indicarían que bajo un reto o infección mayor y más duradero, los individuos mayores poseerían una menor capacidad para mantener unos niveles óptimos o tan elevados como los presentados por los adultos, lo que les conferiría un mayor riesgo a perder la capacidad de responder apropiadamente a señales dañinas o peligrosas con el envejecimiento.

#### ***Valoración de citoquinas y algunos receptores solubles en el plasma procedente de sangre completa incubada en ausencia/presencia de LPS***

Un hecho que debe recalcarse es la relevancia de analizar las citoquinas que pueden ser liberadas por los leucocitos sanguíneos sin fraccionar o purificar. En estas condiciones se preserva mejor el ambiente fisiológico que tienen las células inmunitarias *in vivo*, y resulta fundamental mimetizarlo lo más posible en los estudios *ex vivo*. De hecho, se ha observado que la respuesta inmunitaria podría variar o perderse cuando las células están aisladas (Salvioli *et al.*, 2006). Empleando la sangre completa no sólo se mantienen las interacciones célula-célula, sino que también estarán presentes, y a concentraciones fisiológicas, distintos

agentes inmunomoduladores endógenos. Además, la sangre completa diluida mimetiza las interacciones de la inmunidad celular y humoral *in vivo*, por lo que se ha propuesto como muy útiles para valorar la producción de citoquinas *in vitro* y la modulación de esta producción por factores endógenos y exógenos (De Groote *et al.*, 1992).

Los resultados encontrados en el presente trabajo respecto a los niveles de **IL-6** valorados en el plasma de sangre completa *en ausencia de estímulo*, no muestran diferencias significativas con la edad en ambos sexos, al igual que han descrito otros autores (Hernanz *et al.*, 1996). Por el contrario, su valoración en el plasma de sangre completa *en presencia de LPS* durante 4 h presenta un aumento al avanzar la edad, aumento que interacciona con el factor *género*, ya que en los hombres de 60-79 años tiene lugar un aumento muy significativo con respecto a los adultos, mientras que en las mujeres los niveles de IL-6 no varían con la edad. Resultados semejantes han sido también obtenidos por otros investigadores, es decir, niveles parecidos en hombres y mujeres de 21-40 años de edad pero aumentados sólo en hombres mayores de 65 años (Goetzl *et al.*, 2010). De hecho, Pietschmann y colaboradores (2003) también describieron un dimorfismo sexual en los niveles de IL-6, donde las mujeres mayores, y no los hombres, presentaban una disminución en el porcentaje de monocitos marcados positivamente para IL-6. Por otro lado, muchos autores han observado un aumento de la liberación de IL-6 por parte de los leucocitos de personas mayores tras una estimulación con LPS en relación a sujetos más jóvenes (Rink *et al.*, 1998), y concretamente en células mononucleares (Müller-Alouf *et al.*, 1994; Roubenoff *et al.*, 1998) y en el sobrenadante de cultivo de neutrófilos purificados (Dalboni *et al.*, 2013), independientemente de la concentración de LPS y el tiempo de estimulación empleados. De hecho, este aumento ha sido descrito incluso en personas de edad avanzada sanas que cumplen el protocolo SENIEUR (Gabriel *et al.*, 2002). Además, cabe destacar que varios autores demuestran que en esta mayor liberación de IL-6 no participarían significativamente los linfocitos (Müller-Alouf *et al.*, 1994; Sadeghi *et al.*, 1999), confiriendo un papel principal a los monocitos y a los neutrófilos, los cuales serían los responsables de los elevados niveles observados con el envejecimiento. Sin embargo, también existen estudios donde no se observa diferencias asociadas con la edad en el plasma de sangre completa tras una estimulación con LPS (Hernanz *et al.*, 1996; Bruunsgaard *et al.*, 1999b). La dinámica tan distinta de esta citoquina observada entre hombres y mujeres, junto con el hecho de que los

factores externos y de salud son determinantes en los niveles de la misma (Cohen *et al.*, 1997), pueden ser algunas de las razones por las que se observan estas discrepancias. De hecho, por ejemplo, salvo los estudios específicamente mencionados, los trabajos arriba citados no diferencian los valores de IL-6 según el sexo.

En cuanto a los niveles de **TNF- $\alpha$**  en el sobrenadante de sangre completa *en ausencia de estímulo*, no se ha observado diferencias significativas con la edad, al igual que muestran otros autores (Hernanz *et al.*, 1996; Sadeghi *et al.*, 1999), aunque sí una tendencia hacia unos niveles mayores en mujeres con respecto a los hombres. En cuanto a los niveles *tras la estimulación con LPS*, los resultados muestran un aumento significativo con la edad, especialmente en las mujeres. A pesar de este resultado, los hombres y las mujeres no presentan diferencias significativas entre sí con la edad. Los estudios sobre la liberación de esta citoquina tras el estímulo con LPS indican una mayor producción/liberación de la misma por parte de los leucocitos de personas mayores (Rink *et al.*, 1998), y concretamente al emplear la sangre completa como material biológico, con una concentración y tiempo de incubación similares a los seguidos en la presente tesis (Arranz *et al.*, 2008). Sin embargo, algunos autores apuntan a una ausencia de diferencias, e incluso una disminución de los niveles de TNF- $\alpha$  con la edad (Bruunsgaard *et al.*, 1999b; Gabriel *et al.*, 2002). Estos trabajos, a pesar de haber empleado la sangre completa, usaron una concentración de LPS 4 veces mayor al nuestro, y periodos de incubación de 24 y 72 horas, frente a las 4 horas de nuestro protocolo. Este hecho hace pensar que, el uso de periodos de incubación mayores y con unas concentraciones del mitógeno más elevadas provoca un agotamiento de TNF- $\alpha$  mayor con el envejecimiento. Esta hipótesis, que se ha planteado anteriormente para los niveles de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8 en el sobrenadante de PBMCs, convendría verificarla en el futuro ampliando las 4 horas de exposición al LPS. Por otro lado, cabe destacar que los trabajos que emplean células mononucleares y monocitos purificados del conjunto de tales células, tras una estimulación con LPS, muestran una ausencia de variación de los niveles de TNF- $\alpha$  con la edad (Riancho *et al.*, 1994; Roubenoff *et al.*, 1998; Sadeghi *et al.*, 1999), o bien secretan unos menores niveles de la misma (Gon *et al.*, 1996; Goetzl *et al.*, 2010), en relación a sujetos jóvenes. De hecho, se ha demostrado que los linfocitos no estarían significativamente implicados en la producción de esta citoquina tras una estimulación con LPS (Müller-Alouf *et*

*al.*, 1994; Sadeghi *et al.*, 1999), lo que estaría indicando la importante implicación de los neutrófilos en la contribución de los mayores niveles de esta citoquina.

Los niveles de **IL-10** en el plasma de sangre completa *en ausencia de estimulación* han sido indetectables por el kit comercial empleado, cuyo umbral mínimo de detección era 1,3 pg/ml. Otros autores tampoco han podido determinar dichos niveles de esta citoquina en condiciones basales (van den Biggelaar *et al.*, 2004b). En cuanto a los resultados *tras la estimulación con LPS*, los hombres han presentado una tendencia hacia unos niveles mayores de IL-10 en comparación con las mujeres, pero no se han encontrado diferencias asociadas con la edad en ninguno de los sexos. Dado que esta citoquina anti-inflamatoria puede ser generada por varias células inmunitarias (monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos B y T), y puede ser producida bajo estimulaciones de diversa etiología, son muchas las discrepancias en los niveles de esta citoquina con el envejecimiento, en función de la muestra, diseño experimental o el tipo de leucocito cultivado. Van den Biggelaar y colaboradores (2004b) encontraron una disminución significativa con la edad en los niveles de IL-10 al valorarlos en el sobrenadante de sangre completa tras una estimulación con LPS durante 24 h y a la mitad de concentración a la empleada en la presente tesis. Por el contrario, al cultivar neutrófilos aislados en presencia de LPS se ha descrito unos niveles elevados de IL-10 en personas mayores con respecto a las jóvenes (Dalboni *et al.*, 2013); y sin embargo, al valorar el porcentaje de monocitos marcados positivamente para IL-10 en presencia de LPS, no se han encontrado diferencias significativas con la edad, ni en hombres ni en mujeres (Pietschmann *et al.*, 2003). Los linfocitos T, y concretamente los Th2, son uno de los principales productores de IL-10 (Cakman *et al.*, 1996; Dayan *et al.*, 2000; Zanni *et al.*, 2003). Sin embargo, al haber empleado un mitógeno específico de monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos B, podría ser que la disminución de unos en producir/liberar esta citoquina se viera compensado por el aumento de otros en generarla.

Por lo tanto, el aumento con la edad en los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  en el plasma o sobrenadante de cultivo de sangre completa en presencia de LPS, parece estar indicando una sobreproducción de estas citoquinas pro-inflamatorias por los monocitos y especialmente por los neutrófilos, los cuales serían responsables, al menos en parte, del aumento en el estado inflamatorio observado con el envejecimiento.

En cuanto a los resultados en los niveles del **receptor soluble de IL-6, sIL-6R**, en el plasma procedente de sangre completa estimulada con LPS, no se han observado diferencias significativas ni con el género ni con la edad. Este receptor soluble se une a IL-6 para aumentar su actividad biológica como resultado de la unión del complejo IL-6/sIL-6R al receptor de membrana gp130 (Yasukawa *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1991). Sin embargo, en la bibliografía no se ha encontrado la determinación de sus valores tras una estimulación, como es el LPS. Estos resultados, junto con los obtenidos en plasma y que presentarán más adelante, indican que la presencia de LPS provoca una liberación de este receptor soluble al medio extracelular.

Los resultados sobre los niveles del **receptor soluble I y II de TNF, sTNF-RI y -RII**, valorados en el sobrenadante de cultivo de sangre completa tras la estimulación con LPS, muestran un aumento significativo con la edad. Sin embargo, estos mayores niveles en ambos receptores son debidos, especialmente, a los aportados por los hombres. No obstante, en la edad adulta, 30-49 años, los hombres presentaron unos niveles menores de sTNF-RII que las mujeres. La función de estos receptores consiste en la unión a TNF, tanto  $\alpha$  como  $\beta$ , con el fin de neutralizarlo. Se ha visto que tras una administración *in vivo* de LPS, los niveles plasmáticos del receptor I en personas de 60-68 años muestran una normalización más lenta, es decir, tardan más en volver a niveles fisiológicos en relación a sujetos de 20-29 años. Esto indicaría un defecto con la edad en la capacidad para finalizar la actividad inflamatoria, lo que a su vez contribuiría a una continua activación en la producción de citoquinas por parte de los leucocitos (Krabbe *et al.*, 2004). Así, a las 1,5 horas después de la administración de LPS, los jóvenes muestran un pico mayor que las personas mayores, tras lo cual sus valores disminuyen paulatinamente. En los mayores, sin embargo, los valores máximos, que no llegan a alcanzar nunca los presentados por los jóvenes, se mantienen hasta 3-4 horas después de la administración, resultando en unos niveles más elevados en las personas mayores a las 4 horas (Krabbe *et al.*, 2004). Este hecho podría ser compatible al observado en los resultados obtenidos en la presente tesis, lo que reafirmaría la validez del modelo de sepsis *ex vivo* que se ha empleado en la misma.

### 5.1.3. Cambios con la edad en parámetros de estado inflamatorio y redox

En lo que respecta a la valoración de **compuestos pro-inflamatorios en plasma** con la edad, los resultados obtenidos en la presente tesis muestran un aumento de la **proteína C reactiva (PCR)** con el envejecimiento, especialmente en las mujeres a partir de los 60 años de edad, y aunque no se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres, los primeros presentan niveles mayores que las mujeres a la edad de 50-59 años. El aumento de esta proteína de fase aguda, cuya producción está mediada por señales pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$ , ha sido ampliamente descrito con la edad (Bruunsgaard *et al.*, 2000c; Ferrucci *et al.*, 2005); y hay que tener en cuenta que esta proteína se ha correlacionado con desórdenes cognitivos y se ha propuesto como un factor de riesgo cardiovascular (Teunissen *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2005). Ferrucci y colaboradores (2005) encontraron una interacción entre el factor *edad* y el *género*, lo que indicaría que el aumento en los niveles de la PCR asociados a la edad en hombres y mujeres estaría influenciado por las hormonas sexuales, cuyos niveles disminuyen con el envejecimiento en ambos sexos, pero en distinta magnitud, como se detallará más adelante. Además, el tejido adiposo visceral, cuya masa aumenta con la edad, contribuye al aumento de marcadores inflamatorios como la PCR, en hombres de unos 57 años de edad *versus* jóvenes de unos 28 años (Cartier *et al.*, 2009). Este hecho podría ser una de las causas, al menos en parte, de los mayores niveles observados en los hombres estudiados en la presente tesis en la década de los 50 años con respecto a las mujeres.

En cuanto a los niveles de **IL-6** plasmáticos, los resultados indican un aumento de sus valores con el envejecimiento. Sin embargo, los responsables de este aumento significativo son los hombres, ya que en las mujeres no se observa ninguna variación de esta citoquina a lo largo de las edades estudiadas. Así, a pesar de que a la edad de 30-49 años los hombres presentan una tendencia hacia unos niveles menores que las mujeres, a la edad de 60-79 años, éstos poseen unos niveles significativamente más altos que las mujeres. Son muchos los autores que han descrito un aumento de IL-6 en el plasma con la edad (Cohen *et al.*, 1997; Myśliwska *et al.*, 1998; Haack *et al.*, 1999; Ferrucci *et al.*, 2005; Mariani *et al.*, 2006; Himmerich *et al.*, 2006; Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012). Sin embargo, existen discrepancias significativas, especialmente cuando el factor *edad* se analiza junto al *género*. Algunos investigadores indican que el género no ejerce una influencia sobre los niveles de esta

citoquina con la edad (Himmerich *et al.*, 2006; Mariani *et al.*, 2006), otros que en mujeres no aumentan y sí en hombres (Ferrucci *et al.*, 2005; Goetzl *et al.*, 2010), aunque también se encuentran trabajos donde señalan una ausencia de variación de IL-6 en hombres (Beharka *et al.*, 2001). Al contrario de lo obtenido en la presente tesis, donde las mujeres no presentan diferencias en los niveles plasmáticos de esta citoquina con la edad, algunos autores observaron un gran aumento exponencial en ellas, especialmente tras la menopausia, debido a la pérdida de los estrógenos (Giuliani *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2012). Sin embargo, existe la posibilidad de que las mujeres estudiadas en el presente trabajo estuvieran siguiendo un tratamiento basado en la terapia sustitutiva. Por otra parte, son múltiples los factores que pueden influir sobre los niveles de IL-6 además de la edad, entre los cuales se encuentran el fumar, la obesidad, las infecciones, la disminución de hormonas sexuales, el cáncer, el infarto de miocardio, una presión arterial alta y el genotipo. Además, todos estos factores inducen y modifican la actividad inflamatoria asociada a la edad, pudiendo causar patologías asociadas a la misma (Cohen *et al.*, 19970; Bruunsgaard, 2002; Wright *et al.*, 2006). Así, la IL-6 ha sido propuesta como un indicador del estado funcional de las personas, y por lo tanto, como un marcador de salud (Cohen *et al.*, 1997). De hecho, en un estudio llevado a cabo en personas mayores que cumplían el protocolo SENIEUR, se observó que el aumento de IL-6 en plasma era más pronunciado en personas mayores “casi sanas” que en las “totalmente sanas” que cumplían los criterios de dicho protocolo (Myśliwska *et al.*, 1998). En la misma línea, Bruunsgaard y colaboradores (2003b) encontraron una fuerte asociación entre la elevación de esta citoquina y la mortalidad en ambos sexos. Otro de los factores influyentes, además de los arriba mencionados, sería el estado nutricional ya que el sistema inmunitario es uno de los primeros sistemas en ser afectado por la disminución de ciertos elementos nutricionales (p. ej. el zinc), debido a su alto recambio celular. Así, el aumento de IL-6 se ha correlacionado con bajos niveles de zinc (Mariani *et al.*, 2006). Por otro lado, no sólo los componentes celulares del sistema inmunitario (monocitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, y linfocitos B y T) son capaces de generar IL-6. Otras células como los fibroblastos, las células endoteliales, los adipocitos, los keratinocitos, los osteoblastos, y las células del músculo liso y esquelético también liberan esta citoquina (Pedersen *et al.*, 2001). Concretamente, en el caso de las células endoteliales y los adipocitos, se ha descrito un aumento de su secreción de IL-6, a

nivel sistémico, con el envejecimiento (Belmin *et al.*, 1995; Coppack, 2001; Pedersen *et al.*, 2003b; Cartier *et al.*, 2009).

En lo que respecta a los niveles plasmáticos de **sIL-6R**, éstos no muestran variaciones asociadas a la edad, pero sí al género, ya que los hombres en general presentan menores niveles de este receptor en el plasma que las mujeres. Estos valores inferiores de sIL-6R, receptor que modula a la alza la actividad de IL-6, podría representar un mecanismo compensatorio para evitar una excesiva señalización producida por el aumento de IL-6 en los hombres. Giuliani y colaboradores (2001) describieron un aumento plasmático de los niveles de sIL-6R en mujeres menopáusicas con la edad. Sin embargo, la ausencia de diferencias observadas en la presente tesis en los niveles de IL-6 en mujeres al avanzar la edad podría ser la razón de la invariabilidad en los niveles de sIL-6R en las mismas. De hecho, existen publicaciones que muestran cómo el aumento de sIL-6R con el envejecimiento sólo se da en hombres (Ferrucci *et al.*, 2005).

En lo que respecta a la determinación de **compuestos anti-inflamatorios plasmáticos** con la edad, no se han podido cuantificar los niveles de la citoquina **IL-10** al ser inferior al umbral mínimo de detección, 1,3 pg/ml. Álvarez-Rodríguez y colaboradores (2012) mostraron un aumento significativo de IL-10 circulante, lo que podría ser considerado como un mecanismo compensatorio al estado inflamatorio característico del envejecimiento.

Los niveles en plasma de **sTNF-RI** y **-RII**, obtenidos en la presente tesis, aumentaron significativamente con la edad, especialmente en hombres, y de forma más pronunciada en el caso de los del tipo II que del I. Dado que los hombres presentaron menores niveles de sTNF-RII que las mujeres, especialmente a los 30-49 años, el aumento con la edad fue estadísticamente más significativo en los varones. Otros autores también han observado unos niveles más elevados de estos dos receptores en el plasma del mayor (Haack *et al.*, 1999; Himmerich *et al.*, 2006), incluso en individuos que cumplen el protocolo SENIEUR (Gerli *et al.*, 2000). Este hecho posibilitaría la neutralización de mayores cantidades de TNF- $\alpha$ , que a su vez aumentan con la edad en plasma, como se comentará al discutir el tercer objetivo de la presente tesis. De hecho, con el envejecimiento se ha descrito el aumento de varios antagonistas de citoquinas, lo que formaría parte de un mecanismo compensatorio de la vejez (Catania *et al.*, 1997). En cuanto al factor *género*, algunos autores exponen una influencia débil sobre los niveles de estos receptores (Himmerich *et al.*, 2006). Sin embargo,



pese a que no se ha valorado los niveles de TNF- $\alpha$  en el plasma de los sujetos estudiados en el presente apartado, sí se ha realizado en aquellos del tercer objetivo de la presente tesis, donde, como se puede apreciar, los hombres de 70-79 años muestran unos niveles algo mayores que las mujeres. Así, los niveles de sTNF-RI y -RII podrían estar reflejando la dinámica de dicha citoquina, la cual manifiesta un cierto dimorfismo sexual.

Los resultados obtenidos en la determinación de **compuestos oxidantes**, en lo que a los niveles intracelulares de **GSSG** se refiere, muestran un aumento con el envejecimiento, tanto en **neutrófilos** como en **linfocitos**, especialmente a partir de los 60 años de edad, aunque este incremento ya es significativo en los neutrófilos de mujeres de 50-59 años y en los linfocitos de hombres de esa misma edad. A pesar de que no se ha encontrado ningún artículo original sobre los niveles intracelulares de este oxidante con el envejecimiento humano en ninguno de los dos tipos leucocitarios estudiados en la presente tesis, los datos en otras localizaciones biológicas, como son la sangre completa y el plasma, estarían de acuerdo con dicho aumento al avanzar la edad, tanto en hombres como en mujeres (Samiec *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2006). De hecho, los resultados en leucocitos peritoneales procedentes de ratones viejos corroboran el incremento de GSSG intracelular con la edad (Arranz *et al.*, 2010a).

La relación de los niveles de GSSG y GSH intracelulares, da lugar a la obtención del cociente **GSSG/GSH**, un claro marcador del estado de estrés oxidativo. Con la edad se observa un aumento de este cociente en **neutrófilos** y en **linfocitos**, al igual que se ha descrito en leucocitos peritoneales de ratón (De la Fuente *et al.*, 2004b). En el caso de los neutrófilos, este incremento es especialmente significativo en los hombres de 60-79 años en relación a los otros dos grupos de edad, mientras que en las mujeres, pese a mostrar unos niveles mayores con la edad, éstos no son significativos debido, especialmente, a los niveles de GSH, como se detallará más adelante. Jones y colaboradores (2002) describieron una disminución de la relación GSH/GSSG, la cual presentaba una tasa de decremento casi lineal a partir de los 45 años de edad en el plasma de hombres y mujeres, lo que sugeriría, junto a los datos de GSSG, que con el envejecimiento tiene lugar un continuo aumento de eventos oxidativos tanto en el medio extracelular como dentro de las células inmunitarias.

En lo que respecta a la actividad de la **xantina oxidasa** en plasma, los resultados indican una disminución asociada a la edad, especialmente en las mujeres, cuyos niveles quedan por

debajo de la mostrada por los hombres a la edad de 60-79 años. Esta enzima, que es interconvertible en determinadas condiciones con la xantina deshidrogenasa, otra forma de la misma enzima conocida como xantina oxidoreductasa, es productora de numerosos ROS y RNS (Valko *et al.*, 2007). Al contrario de lo obtenido en la presente tesis, la bibliografía indica una correlación positiva entre la actividad de xantina oxidasa y la edad, en el plasma de ratón y humano (Aranda *et al.*, 2007; Vida *et al.*, 2011), así como en leucocitos peritoneales y en diversos tejidos de ratón (Arranz *et al.*, 2010a; Vida *et al.*, 2011). Una posible explicación de esta discrepancia, podría ser el haber detectado menos actividad de la que realmente se encuentra en el plasma, ya que la xantina oxidoreductasa además de circular por el plasma en forma libre, circula formando inmunocomplejos, lo que hace neutralizar su actividad (Harrison, 2002), impidiendo su detección por el kit empleado. Así, una mayor formación de inmunocomplejos con el envejecimiento, podría falsear los resultados.

Por otro lado, los datos obtenidos en la presente tesis sobre diversos **compuestos antioxidantes**, indican un comportamiento diferencial entre los niveles de **GSH** en neutrófilos y linfocitos con el envejecimiento. En los **linfocitos**, éstos muestran una disminución con la edad a nivel de la población total, aunque este descenso significativo se pierde al analizar hombres y mujeres por separado. Son muchos los autores que muestran una disminución de los niveles de GSH con la edad en diversas localizaciones en humanos, como en eritrocitos, neutrófilos, linfocitos y plasma (van Lieshout y Peters, 1998; Samiec *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2008; Alonso-Fernández *et al.*, 2008), así como en leucocitos peritoneales de ratón (Arranz *et al.*, 2010a). De hecho, en la presente tesis también se ha obtenido una disminución progresiva de los niveles plasmáticos de **glutación total**, parámetro que cuantifica ambas formas del glutatión, si bien la parte que corresponde a GSH es mucho mayor que la de GSSG (relación 30-100 a 1, respectivamente) (Hwang *et al.*, 1992), por lo que la disminución de este valor sería debido principalmente al descenso de los niveles de GSH en plasma. Por el contrario, los niveles de GSH en **neutrófilos** aumentan al avanzar la edad, especialmente en las mujeres, las cuales muestran un aumento muy significativo a los 60-79 años. Los hombres, cuyos valores permanecen siempre mayores que en las mujeres, no mostraron ninguna variación relacionada con la edad. El aumento en los niveles de GSH con el envejecimiento podría ser debido a un mecanismo compensatorio por la mayor cantidad de ROS presente en los neutrófilos, ya que la funcionalidad de estas

células se encuentra estrechamente ligada a la producción de radicales libres, y por lo tanto son especialmente sensibles al daño oxidativo. De hecho, algunos autores indican que los leucocitos PMN de individuos viejos poseen elevadas cantidades de enzimas antioxidantes retenidas en su interior, como la SOD, tanto en condiciones de reposo como de activación, con el fin de paliar la elevada producción de ROS y RNS que presentan (Pawelec *et al.*, 1998). Sin embargo, pese al esfuerzo de los neutrófilos por mantener un adecuado equilibrio redox (incrementando sus niveles de GSH), estas células muestran, a su vez, un aumento de GSSG, lo que resulta en mayores niveles del cociente GSSG/GSH con el envejecimiento, como ya ha sido mencionado anteriormente. Estos resultados, junto con los obtenidos en linfocitos, corroborarían el deterioro funcional que muestran ambos tipos de células con la edad, ya que no poseerían niveles de glutatión suficientes para llevar a cabo una adecuada respuesta inmunitaria (Dröge *et al.*, 1994; Meydani *et al.*, 1995; Arranz *et al.*, 2008).

En cuanto a la **capacidad antioxidante total (TAC)** del **plasma** y de las **células sanguíneas**, los resultados muestran unos valores mayores a medida que avanza la edad, aumento que es especialmente significativo en mujeres. Los hombres, cuyos valores no muestran cambios significativos asociados a la edad, presentan unos niveles mayores que las mujeres, en los tres grupos de edades estudiados. Estos resultados, especialmente los del plasma, no eran de esperar, ya que la bibliografía muestra una disminución del potencial reductor del plasma con el envejecimiento (De Gonzalo-Calvo *et al.*, 2010; Pandey y Rizvi, 2010; Kaszubowska *et al.*, 2011). A pesar de que se han desarrollado un gran número de metodologías para valorar la capacidad antioxidante del plasma, son muchos los autores que califican su cuantificación como problemática (Ghiselli *et al.*, 2000). Por un lado, existe una enorme fracción de antioxidantes plasmáticos sin identificar, cuya aportación a la TAC, en términos cuantitativos, es el más importante, contribución que, además, aumenta con el envejecimiento (Wayner *et al.*, 1985; Aejmelaeus *et al.*, 1997). Además, se ha comprobado que los distintos valores de TAC obtenidos por distintas metodologías no muestran correlaciones satisfactorias (Cao y Prior, 1998; Bartosz, 2010). Por otro lado, los ensayos convencionales para determinar la TAC miden, fundamentalmente, la capacidad antioxidante en el compartimento acuoso del plasma, como lo hace el kit empleado en la presente tesis. Consecuentemente, éstos miden los antioxidantes solubles en agua como el ácido ascórbico, el ácido úrico y las proteínas tiólicas, mientras que los antioxidantes

hidrofóbicos, como el tocoferol y los carotenoides, no pueden ser medidos mediante estos métodos (Yeum *et al.*, 2004). Similarmente, las actividades enzimáticas no pueden ser valoradas en los ensayos de TAC, lo que conduciría a un resultado irreal de la capacidad antioxidante del plasma. Además, los compuestos y enzimas antioxidantes presentes en las células sanguíneas y en la pared de los vasos sanguíneos ejercen un profundo impacto sobre las propiedades antioxidantes del plasma, los cuales no están reflejados en el ensayo *in vitro* de la muestra plasmática aislada (Bartosz, 2010).

Una posible explicación del aumento observado en la capacidad antioxidante total, es la aportación del ácido úrico. Este compuesto es uno de los principales antioxidantes cuya concentración en plasma (42% de los antioxidantes presentes en el plasma) es considerablemente mayor que el de otros antioxidantes importantes, como p. ej. el ascorbato (3%), y por lo tanto es el que realiza la mayor contribución, junto a los antioxidantes sin identificar (35%), al valor de TAC (Ames *et al.*, 1981; Aejmelaeus *et al.*, 1997). Al igual que los resultados de la presente tesis, donde los factores *edad* y *género* muestran una interacción, Aejmelaeus y colaboradores (1997) describieron un aumento altamente significativo de TAC a mayor edad en mujeres, mientras que en los hombres no se observó esta dinámica clara. Es más, observaron que estas variaciones en la TAC en plasma eran debidas al ácido úrico, cuya contribución a la TAC aumentaba con la edad (hasta un 57%). Así, siguiendo la recomendación de Ghiselli y colaboradores (2000), que advierten de la necesidad de complementar la medida de TAC con la del ácido úrico, los resultados de la presente tesis indican que existe una correlación positiva y significativa entre los niveles de TAC y de ácido úrico. Además, cabe destacar que los niveles de TAC fueron mayores en hombres que en mujeres. De hecho, los hombres presentaron los mayores niveles de ácido úrico, independientemente de la edad, lo que podría explicar por qué no se han observado diferencias en los niveles de TAC en hombres. Es más, se ha descrito que, en las mujeres, la concentración de ácido úrico en plasma es menor que en hombres hasta la década de los 60 (edad a partir de la cual aumenta) posiblemente debido al papel regulador del estradiol sobre la biosíntesis de purinas y el metabolismo del ácido úrico (Aejmelaeus *et al.*, 1997). La pérdida de los estrógenos daría lugar al aumento de ácido úrico, y consecuentemente al valor de TAC en las mujeres de más de 60 años. Además, la producción de ácido úrico va acompañada por la generación de grandes cantidades de ROS a través de la xantina oxidasa

(Harrison, 2004), por lo que los mayores niveles de ácido úrico, estarían indicando una situación de mayor estrés oxidativo. Sin embargo, también hay que puntualizar que la ausencia de diferencias asociadas a la edad en los niveles de la TAC, observado por Gil y colaboradores (2006) así como en los hombres analizados en la presente tesis, podría ser debida a las influencias metabólicas y nutricionales que determinan el ácido úrico, más que al balance entre prooxidantes y antioxidantes. Otra posible causa del aumento de la capacidad reductora del plasma, que no excluiría a la anterior, radica en las células sanguíneas, ya que éstas poseen un profundo impacto en las propiedades antioxidantes del plasma (Bartosz, 2010). Los eritrocitos poseen un sistema redox en su membrana plasmática que transfiere electrones desde sustratos intracelulares a aceptores de electrones extracelulares. Así se ha visto que existe una correlación positiva entre la actividad de este sistema en eritrocitos y la edad, lo que podría indicar un mecanismo protector del sistema con el fin de aportar una capacidad de reducción extracelular eficiente (Rizvi *et al.*, 2006), lo que podría dar lugar a un aumento de la TAC.

Finalmente, como parámetro indicativo del **daño debido al estrés oxidativo**, los niveles de **8-isoprostano**, que fueron analizados en la presente tesis, han mostrado un aumento significativo con la edad, especialmente en los hombres, cuyos valores a los 60-79 años son los mayores en relación a edades más jóvenes y a las mujeres de esa misma edad. Este incremento al envejecer es coincidente con el obtenido en otros compuestos relacionados con la peroxidación lipídica en plasma, como el MDA (Kasapoglu y Ozben, 2001; Inal *et al.*, 2001; Junqueira *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2006). Además, con el envejecimiento también se ha descrito un aumento de 8-isoprostano en otras localizaciones como la orina o el líquido cefalorraquídeo (Wang *et al.*, 1995; Peskind *et al.*, 2014). Estos mayores niveles reflejarían un déficit de antioxidantes y la existencia de estrés oxidativo en plasma (Valko *et al.*, 2007), especialmente en los hombres mayores.

#### 5.1.4. Diferencias de género en los parámetros estudiados y discusión general

Son numerosas las diferencias que se han observado asociadas al **género** en las funciones inmunitarias con el envejecimiento, especialmente en las citoquinas y los compuestos pro- y anti-inflamatorios valorados en la presente tesis. En muchas de ellas, las mujeres parten de unos valores más óptimos que los hombres en la edad adulta, pero a

medida que avanza la edad éstas sufren un deterioro de las funciones más llamativo. Este es el caso de la *quimiotaxis* y la *movilidad espontánea* de *neutrófilos* y *linfocitos*, de la *respuesta proliferativa en respuesta a PHA* y la *capacidad proliferativa* de los linfocitos, de los niveles de *TNF- $\alpha$*  en el *plasma procedente de sangre completa estimulada con LPS* y la *PCR*. Interesantemente, esta misma dinámica es la que presentan los niveles de *GSSG* en *neutrófilos* y el cociente *GSSG/GSH* en *linfocitos*, los cuales serían en gran medida los responsables de la buena funcionalidad inmunitaria presentada por las mujeres en la edad adulta y del cambio funcional observado en los leucocitos con el envejecimiento (Meydani *et al.*, 1995; Arranz *et al.*, 2008). Es más, a nivel plasmático, los niveles de *glutación total* y la *capacidad antioxidante total* también muestran esta dinámica. La disminución de los compuestos antioxidantes circulantes, resultaría en una menor captación de estas defensas por las células del organismo, y en concreto por los leucocitos, dificultando la eliminación del exceso de radicales libres intracelulares. Además, en algunas funciones (como los niveles de *anión superóxido intracelulares*, la *respuesta proliferativa en ausencia de estímulo*, la *actividad citotóxica NK*, los niveles de *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  e *IL-8* en el *sobrenadante de células mononucleares estimuladas con PHA*, los niveles de *IL-6* e *IL-10* en el *plasma de sangre completa estimulada con LPS*, los niveles de *IL-6* y *sTNF-RII* en plasma, así como los niveles de *GSSG* en *linfocitos*), las mujeres presentan unos mejores valores que los hombres en su edad adulta/adulta-madura. Los hombres, por el contrario, muestran un mayor deterioro de estos parámetros ya a la edad de 50-59 años. Estas diferencias asociadas al género estarían mediadas en gran parte por los estrógenos, cuyo papel protector, inmunomodulador y antioxidante se ha visto estrechamente ligado con una óptima funcionalidad inmunitaria, inhibiendo la expresión génica y la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la activación de NF- $\kappa$ B (Deshpande *et al.*, 1997; Ray *et al.*, 1997; Kamada *et al.*, 2001; Cioffi *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Gameiro *et al.*, 2010). De hecho, son muchos los trabajos que indican un sistema inmunitario más activo y un menor estado pro-inflamatorio en las mujeres que en los hombres, aunque estas diferencias se anularían con la edad (Clark y Peterson, 1994; Bruunsgaard *et al.*, 1999b; Austad, 2006; Eskes y Haanen, 2007; Wikby *et al.*, 2008). Así, con el envejecimiento, la pérdida de los estrógenos provocaría cambios en el sistema inmunitario y el aumento del estado inflamatorio en las mujeres, incluso a unos niveles mayores que los hombres (Girasole *et al.*, 1990; Kamada *et al.*, 2001; Cioffi *et al.*, 2002; Yasui *et al.*, 2007; Gameiro *et al.*, 2010). De hecho, cabe destacar que la disminución en los niveles

de las hormonas sexuales con la edad ocurre en distinta magnitud en cada sexo: las mujeres mayores poseen una quinta parte de estradiol en relación a las jóvenes, mientras que los hombres muestran la mitad de testosterona que en la juventud. Además, los niveles de estradiol son claramente superiores en hombres de edad avanzada que en mujeres de esa misma edad (Pietschmann *et al.*, 2003). Por lo tanto, las alteraciones en los niveles de las hormonas sexuales con el envejecimiento podrían explicar por qué el deterioro de la funcionalidad inmunitaria en las mujeres tras alcanzar la menopausia es más patente que en los hombres, cuyos valores, en general, se alteran menos, posiblemente, al carecer de los beneficios de los estrógenos a lo largo de su vida. Sin embargo, esta carencia de estrógenos en los hombres podría ser la responsable de los elevados niveles de daño asociado a estrés oxidativo que presentan en general, y especialmente aquellos de 60-79 años, en relación a las mujeres, como se ha comentado para los niveles de 8-isoprostano, marcador de daño oxidativo a lípidos.

En **conclusión**, con el envejecimiento, los neutrófilos y los linfocitos muestran cambios en las distintas funciones que llevan a cabo, conduciendo a una respuesta inmunitaria inadecuada, cambios en los cuales el factor *género* ejerce algunas influencias. Además, con la edad tiene lugar una desregulación en la liberación de varias citoquinas por parte de los leucocitos, desequilibrio donde los monocitos y especialmente los neutrófilos jugarían un papel clave en el aumento de ciertas citoquinas pro-inflamatorias, como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Así, el estado de “inflamm-aging” estaría mediado principalmente por las células que componen el sistema inmunitario innato, los fagocitos. Con la finalidad de compensar esta elevada inflamación, el organismo liberaría mayores cantidades de mediadores anti-inflamatorios, como los receptores solubles de TNF I y II e IL-10. Además, el desequilibrio en el balance entre oxidantes y antioxidantes con la edad, observado en los neutrófilos y los linfocitos de sangre periférica así como en el plasma y las células sanguíneas, estaría en la base de la alteración de la funcionalidad del sistema inmunitario. Los resultados obtenidos en la presente tesis parecen indicar la validez de la mayoría de los parámetros analizados como marcadores de edad biológica, especialmente en las mujeres, cuyos valores óptimos en la edad adulta provocan que el deterioro asociado a la edad sea más patente en términos estadísticos.

## 5.2. RITMOS BIOLÓGICOS EN EL SISTEMA INMUNITARIO

Desde los orígenes, los seres vivos han estado sujetos a una organización temporal marcada por la rotación de la Tierra sobre su eje y su translación alrededor del sol. Así, todos los sistemas vivos han generado mecanismos para calcular la hora del día y el momento del año mediante relojes internos que les permiten predecir las oscilaciones del medio ambiente para que su fisiología responda de forma preventiva y anticipatoria, con la ventaja adaptativa que ello conlleva (Lucas-Sánchez *et al.*, 2012).

Prácticamente todas las variables fisiológicas oscilan con una periodicidad determinada, confiriendo una estructura temporal que permite un adecuado funcionamiento de los organismos, promoviendo el bienestar y un aumento de la esperanza de vida. Sin embargo, la alteración del sistema circadiano puede contribuir a acelerar el proceso de envejecimiento, resultando en una menor esperanza de vida (Gibson *et al.*, 2009; Froy, 2011). Así, los niveles de una infinidad de parámetros biológicos, como los pertenecientes al sistema neuroinmunoendocrino, oscilan en función del momento del día, del mes o del año (Haus, 2007). Es más, las variaciones circadianas también pueden ser modificadas en función de la estación del año en el que se encuentre un organismo, lo que indica la existencia de cambios estacionales de los patrones circadianos (Lévi *et al.*, 1988a).

Los ritmos típicamente estudiados han sido aquellos que poseen un carácter conductual como la actividad motora, el ciclo sueño-vigilia, o los ritmos alimenticios, así como la temperatura corporal, la presión arterial, y las frecuencias cardíaca y respiratoria, todas ellas muy útiles a la hora de realizar una evaluación funcional del sistema circadiano debido a su robustez. Sin embargo, pese a que existe mucha bibliografía sobre las alteraciones de los ritmos con la edad en los parámetros arriba citados y en parámetros endocrinos, especialmente los referentes a las hormonas melatonina y cortisol (Skene y Swaab, 2003; Hofman y Swaab, 2006; Kondratova y Kondratov, 2012), no es así en lo que respecta a la funcionalidad del sistema inmunitario en el contexto del envejecimiento. Por todo ello, el objetivo del presente apartado fue estudiar el efecto del ritmo circadiano y circanual sobre la funcionalidad de los leucocitos de sangre periférica humana, así como el impacto del envejecimiento en los efectos de tales ritmos.



### 5.2.1. Cambios en las funciones de neutrófilos y linfocitos de sangre periférica de jóvenes y septuagenarios, en dos horas distintas del día

Con el fin de observar posibles cambios circadianos en la funcionalidad de los leucocitos, y cómo los mismos podrían modificarse por la edad, se llevaron a cabo las tomas de muestras sanguíneas en dos horas distintas del día, las 10:00h y las 15:00h, en dos grupos de edad, tanto jóvenes (20-29 años) como septuagenarios (70-79 años). Esta experimentación fue iniciada y finalizada durante el mes de febrero, es decir, durante la misma época del año para evitar posibles influencias debidas a los ritmos circanuales.

Los resultados obtenidos muestran, en el caso de los jóvenes, unos valores similares en la **adherencia** de **neutrófilos** y **linfocitos** en ambas horas estudiadas. Esto podría verse apoyado por la falta de variaciones circadianas en las moléculas de adhesión, como ICAM-1, VCAM-1 y L-selectina, que en individuos adultos ha sido observada por otros autores (Ogha *et al.*, 1999). Por el contrario, en los septuagenarios, se han apreciado unos niveles mayores a las 15:00h con respecto a las 10:00h en ambos tipos celulares, y si bien en neutrófilos dicho aumento no es estadísticamente significativo, da lugar, al igual que en los linfocitos, a unos valores mayores de adherencia que los presentados por los jóvenes a la misma hora. Como ya se ha mencionado, apenas hay trabajos donde estudien las variaciones circadianas en las funciones de los leucocitos con la edad. Así, los datos que se pueden emplear para contrastar los resultados de esta tesis, son los controles presentados en aquellos estudios que se han llevado a cabo en este contexto, de valorar algunas funciones en distintos momentos del día, pero que se centran en diversas patologías. En un trabajo de estas características, donde se emplearon individuos controles de 68 años de edad media, sin embargo, no se describe cambios en los niveles de VCAM-1 entre el día y la noche (Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2008). No obstante, los individuos poseían una edad algo menor a los sujetos de nuestro estudio. En otro estudio realizado por nuestro grupo de investigación, los leucocitos peritoneales de ratones viejos mostraron un aumento de su adherencia a las 13:00h y a las 18:00h con respecto a las 8:00h y unos valores mayores que los correspondientes en animales adultos (Maté *et al.*, 2010), lo que sí concordaría con lo encontrado en humanos en la presente tesis.

En cuanto a los resultados obtenidos en la **quimiotaxis** de **neutrófilos** y de **linfocitos**, éstos muestran valores menores de esta capacidad a las 15:00h con respecto a las 10:00h en

ambos grupos de edad, siendo, en todo momento, inferiores en los septuagenarios que en los jóvenes, especialmente en el caso de los linfocitos. En neutrófilos de rata se ha observado un aumento significativo de dicho parámetro a las 16:00h (Berger y Slapnicková, 2003). La aparente discrepancia con los resultados en humanos de la presente tesis podría deberse a la diferencia de especie animal, de hora del día estudiada y a la utilización de un agente quimiotáctico distinto, suero de conejo activado con zimosan (un glucano extraído de las paredes de levaduras). En un estudio en ratones, nuestro grupo de investigación encontró una disminución de la capacidad quimiotáctica de leucocitos peritoneales tanto en animales adultos como en viejos a las 13:00h en comparación con las 8:00h, disminución que continuaron mostrando los individuos viejos a las 18:00h, especialmente en el caso de los linfocitos (Manassra *et al.*, 2011). Este paralelismo entre lo observado en leucocitos peritoneales de ratones ICR/CD-1 y de sangre periférica humana se ha detectado en toda una serie de funciones inmunitarias que han sido analizadas utilizando la misma metodología para las células de ambas especies (De la Fuente y Miquel, 2009).

Por otro lado, no se han encontrado variaciones ni en el índice ni en la eficacia de **fagocitosis** de individuos jóvenes y septuagenarios en función de la hora estudiada. En este sentido, otros autores también observaron una ausencia de variaciones en la función fagocítica durante el día y concretamente en las horas que corresponderían a las empleadas en el presente estudio, pero sí a última hora del día y por la noche (Kaplan *et al.*, 2008). De hecho, existen muchos estudios que relacionan esta función fagocítica con los niveles de melatonina. Así, los experimentos *in vitro* han demostrado una implicación directa, dosis dependiente, de la melatonina sobre la modulación de la fagocitosis (Rodríguez *et al.*, 1999; Terron *et al.*, 2002). En este sentido, algunos autores apuntan a una mayor actividad fagocítica durante el día, cuando los niveles de melatonina son casi indetectables, que durante la noche. Por lo tanto, esta hormona parece ejercer una regulación negativa sobre dicha función (Roy *et al.*, 2008). De la misma forma, algunos autores indican que existe una disminución de la fagocitosis de partículas de 2-hidroxietilmetacrilato durante las últimas horas del día (20:00h y 00:00h), y unos niveles mayores a lo largo de la mañana (8:00h y 12:00h) (Berger y Slapnicková, 2003). Cabe destacar que en este estudio citado, paralelo al uso de las partículas mencionadas, emplearon levaduras, y aunque al cabo del día se observó un ligero aumento, a lo largo de todo el día no se observaron cambios significativos en los

niveles de la fagocitosis. Sin embargo, otros autores postulan una regulación de la melatonina sobre la fagocitosis totalmente distinta, donde se observaría una correlación positiva entre ambos parámetros, obteniendo unos mayores niveles de fagocitosis cuando los niveles de la melatonina, bien exógena o fisiológica, son altos (Melchart *et al.*, 1992; Paredes *et al.*, 2007).

Al considerar los resultados obtenidos en los niveles de **anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )**, se observa que *en condiciones basales* los jóvenes mostraron una disminución significativa a las 15:00h que no tuvo lugar en los septuagenarios. Por el contrario, *en condiciones estimuladas*, las cantidades de  $O_2^{\cdot-}$  a las 10:00h y a las 15:00h fueron similares en los jóvenes, mientras que en los septuagenarios disminuyeron a las 15:00h con respecto a las 10:00h. Sin embargo, al analizar *el porcentaje de estimulación*, es decir, la relación entre los valores detectados en condiciones basales y estimuladas, los jóvenes presentaron porcentajes mayores a las 15:00h con respecto a las 10:00h, aumento que no fue observado en los septuagenarios. Puesto que la producción de  $O_2^{\cdot-}$  forma parte del proceso fagocítico, son muchos los autores que, al igual que en la fagocitosis, lo han relacionado con los niveles de melatonina, observando una dinámica circadiana de la cantidad de ese radical libre de oxígeno en función de la de la melatonina, presentando una correlación negativa entre sí. De este modo, por la noche se obtendrían menores cantidades de  $O_2^{\cdot-}$  (Rodríguez *et al.*, 1999; Paredes *et al.*, 2007) y sus variaciones circadianas serían más patentes con los cambios de luz/oscuridad. No obstante, otros investigadores encontraron un aumento de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  por la tarde (Berger y Slapnicková, 2003), lo que apoyaría nuestros resultados en los jóvenes, aumento que, sin embargo, no mostraron los individuos septuagenarios. La diferencia circadiana en la cantidad de  $O_2^{\cdot-}$  con la edad, concretamente la observada en condiciones de estimulación, podría estar indicando un debilitamiento de los mecanismos microbicidas hacia el atardecer en las personas mayores.

En lo referente a la **respuesta proliferativa** de los linfocitos, *en condiciones basales*, no se encontraron diferencias entre las 10:00h y las 15:00h en ninguno de los dos grupos de edad, si bien los septuagenarios presentan unos valores mayores que los jóvenes en los dos puntos del día analizados. Eskola y colaboradores (1976) observaron una mayor proliferación basal en sujetos jóvenes a las 8:00h y a las 20:00h, y menores a las 14:00h y a las 2:00h, de manera que dicho parámetro presentaría un ciclo bifásico dentro de las 24 horas del día. Así,

los cambios apuntados en ese trabajo podrían haber sido no observados en la presente tesis. En cuanto a la proliferación *en presencia de PHA*, la bibliografía apunta a un aumento progresivo de la misma en los jóvenes desde las 8:00h hasta las 20:00h, a medida que los niveles de cortisol disminuyen, mostrando una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de cortisol y la respuesta proliferativa a PHA (Eskola *et al.*, 1976). Sin embargo, en nuestros resultados, los jóvenes no tuvieron variación alguna, pero sí los septuagenarios los cuales mostraron un aumento de la proliferación a las 15:00h. Además, la *capacidad de estimulación proliferativa* disminuyó en los jóvenes a las 15:00h con respecto a las 10:00h, mientras que los septuagenarios, que mostraron valores muy por debajo a los de los jóvenes, no presentaron esta variación. Cabe destacar que, al haber realizado el análisis de la proliferación en linfocitos aislados de sangre periférica, y no en sangre completa, lo que representaría un sistema más parecido a una situación "real", se han podido perder los efectos de factores séricos y de otras células sanguíneas que podrían influir sobre esta función. De hecho, en un estudio realizado en linfocitos aislados frente a PHA, los resultados mostraron una disminución progresiva en la respuesta proliferativa a lo largo del día, paralela a la disminución en los niveles de cortisol (Tavadia *et al.*, 1975), lo que apoyaría lo observado en nuestros jóvenes. Por otro lado, también se ha descrito que la respuesta proliferativa de linfocitos peritoneales de ratones adultos disminuye a las 18:00h en relación a las 8:00h, pero muestra a las 13:00h un ligero aumento significativo con respecto a las 8:00h (Manassra *et al.*, 2011). Este hecho podría suceder en humanos, pero en nuestro diseño no habría sido observado por la elección de las dos horas estudiadas. Además, en ese mismo estudio comentado, en el caso de los ratones viejos, los mismos presentan un aumento de la proliferación a las 13:00h con respecto a las 8:00h, siendo los valores a las 18:00h similares a los de las 13:00h (Manassra *et al.*, 2011), lo que apoyaría el aumento observado en los septuagenarios de nuestro estudio a las 15:00 horas.

En cuanto a la **actividad citotóxica** de las células NK, varios autores apuntan a una fuerte asociación directa entre el cortisol y la actividad NK, presentando esta función unos niveles bajos a primeras horas de la mañana (6:00h), los cuales irían aumentando hasta las 12:00h, debido a la liberación de cortisol por el eje HHA (McGlone *et al.*, 1991; Kronfol *et al.*, 1997). En los resultados de la presente tesis, sin embargo, no se aprecian diferencias entre la actividad NK a las 10:00h y las 15:00 en jóvenes, posiblemente debido a que al no haberse

valorado a las 12:00h no se pudo detectar el pico de esa hora del día que señalan los autores previamente comentados. Los septuagenarios, por otro lado, presentaron una disminución a las 15:00h con respecto a las 10:00h, obteniendo unos valores mucho menores que los jóvenes, especialmente a las 15:00h, lo que indicaría una mayor vulnerabilidad a procesos infecciosos y cancerosos a primera hora de la tarde en individuos mayores.

Desafortunadamente, en los estudios sobre cronobiología hay frecuentes discrepancias en los resultados publicados. Las razones pueden ser varias: 1) Las diferencias en los *procedimientos metodológicos*, e incluso empleando un mismo protocolo, pequeñas variaciones del mismo; 2) Las *horas en las que se lleva a cabo la medición o extracción* de la muestra, ya que cada grupo de investigación establece un cronograma de acuerdo con las posibilidades y/o limitaciones del trabajador y del tipo de parámetro que se va a valorar. Al no ser coincidentes las horas utilizadas en los diferentes estudios, las comparaciones de los resultados se hace difícil. Por lo tanto, pese a que lo ideal sería hacer múltiples mediciones durante las 24 horas del día, lo cual puede ser relativamente fácil para algunas valoraciones como por ejemplo, la actividad locomotora y la temperatura, e incluso para parámetros que puedan ser analizados en un material biológico relativamente accesible como la saliva o la orina, la utilización de sangre periférica para hacer análisis seriados a lo largo del día, posee muchas limitaciones, especialmente en humanos sanos que no se encuentran hospitalizados. 3) Las *condiciones de estabulación* en los animales de experimentación, los cuales, como sucede en los roedores, debido a su carácter nocturno, tienen su periodo de descanso coincidente con el horario laboral del investigador. La estabulación con ciclo invertido puede anular ese problema. 4) El *género*. Si bien en ratones los ciclos estrales se sincronizan, en mujeres, las diferentes etapas del ciclo menstrual en el que se encuentran las participantes de un estudio, con las consecuentes diferencias en las hormonas sexuales, pueden provocar distintos efectos sobre el sistema inmunitario (O'Brien *et al.*, 2007; Dennison *et al.*, 2012), dado que algunas variaciones inmunitarias podrían ser debidas al efecto de dichas hormonas. 5) El *sueño*, además de ser un sincronizador de los ritmos, es un factor regulador del sistema inmunitario, por lo que pequeñas variaciones en su cantidad o calidad pueden cambiar el patrón de los valores de parámetros endocrinos e inmunitarios (Dickstein y Moldofsky, 1999). Por lo tanto, todos los participantes de un estudio sobre ritmos fisiológicos, deberían referir un sueño óptimo. 6) Las *variaciones estacionales*

también podrían influir a la hora de comparar dos trabajos sobre ritmos circadianos. 7) Por último, y es un aspecto abordado en la presente tesis, tenemos la *edad* de los sujetos analizados, ya que son muy pocos los trabajos que además de estudiar el efecto de los ritmos sobre una determinada función, consideren como segundo factor la influencia de la edad. Además, en las investigaciones sobre diversas patologías donde se realizan valoraciones a lo largo del día, la edad de los controles suele ser muy heterogénea, imposibilitando una adecuada comparación de los sujetos investigados.

En este contexto, los resultados de la presente tesis muestran cambios en la funcionalidad de las células inmunitarias, entre las dos horas estudiadas, al envejecer. Así, los septuagenarios, además de presentar un claro deterioro funcional en los valores de los parámetros estudiados con respecto a los jóvenes, al igual que se ha descrito en el primer objetivo, mostraron, en algunos casos, unos ritmos diferentes (la adherencia de linfocitos, la cantidad de  $O_2^-$  en condiciones estimuladas, la proliferación de linfocitos en presencia de PHA y la actividad NK), en otros una pérdida de las variaciones circadianas (la producción basal y el porcentaje de estimulación de los niveles de  $O_2^-$ , y la capacidad de estimulación proliferativa), e incluso variaciones más prominentes que la obtenida en los individuos jóvenes como se observó en la quimiotaxis de linfocitos. Sin embargo, algunas funciones no mostraron diferencias circadianas, al comparar las dos horas estudiadas, en jóvenes y septuagenarios. Curiosamente, tales funciones, como son la adherencia, la quimiotaxis, y el índice y la eficacia fagocítica, corresponden a los neutrófilos. Así, el deterioro de los ritmos en la funcionalidad leucocitaria con la edad ha sido más patente en linfocitos que en neutrófilos, dado que todas las funciones de linfocitos estudiadas han mostrado cambios en las variaciones circadianas en los individuos mayores.

Por otro lado, los resultados obtenidos a las 15:00h presentan unos niveles más “envejecidos”, es decir, más parecidos a individuos cronológicamente mayores, que los obtenidos a las 10:00h (quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos, y la capacidad de estimulación proliferativa), tanto en jóvenes como en septuagenarios, aunque especialmente en estos últimos, como puede observarse en el porcentaje de estimulación de  $O_2^-$ , la adherencia y la quimiotaxis de linfocitos y la actividad NK. Por tanto, parece que la capacidad funcional de los leucocitos a las 15:00h podría resultar menos efectiva que a las 10:00h. Así, por la tarde, las personas tendrían una menor capacidad de enfrentarse a un reto inmunológico,

especialmente si son mayores. De la misma forma, Manassra y colaboradores (2011) demuestran una inmunosenescencia en la funcionalidad de leucocitos peritoneales murinos a las 18:00h, la cual comenzaría a las 13:00h.

Tal y como se ha apuntando en la sección de la introducción correspondiente a la cronobiología y también a lo largo de este apartado de la discusión, las hormonas parecen jugar un papel muy importante en la regulación del sistema inmunitario. Durante el día, un individuo adulto sano mostraría un patrón caracterizado por niveles altos de cortisol y bajos de melatonina, mientras que durante la noche se observarían bajos niveles de cortisol, altos de melatonina y unos niveles aumentados de citoquinas pro-inflamatorias (Petrovsky, 2005). Sin embargo, con la edad dicho patrón se alteraría, modificando las influencias que ejercen tales hormonas sobre la funcionalidad de los leucocitos. Al avanzar la edad, los niveles nocturnos de melatonina circulante disminuyen, observándose un patrón de secreción alterado (Reiter, 1995; Simonneaux y Ribelayga, 2003). Esta hormona, conocida por su papel antioxidante e inmunopotenciador, se encuentra implicada en la regulación tanto de la inmunidad humoral como de la celular, estimulando la producción de células NK, monocitos y linfocitos, regulando el proceso fagocítico, alterando el balance Th1/Th2 hacia Th1, y estimulando la producción de citoquinas como IL-2, IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Berger y Slapnicková, 2003; De la Fuente y Díaz, 2007; Roy *et al.*, 2008; Srinivasan *et al.*, 2008). Por ello, su disminución con la edad provocará una alteración en los ritmos de la funcionalidad del sistema inmunitario. Además, un rasgo muy común en individuos mayores, la alteración del ciclo sueño/vigilia caracterizado por una disminución de la amplitud y fragmentación del sueño (Turek *et al.*, 1995; Dijk *et al.*, 1999), podría promover, a su vez, una mayor alteración en los patrones de secreción de melatonina, causando, consecuentemente, un desajuste en el patrón circadiano de las funciones de los leucocitos con el envejecimiento. Dado que el sueño es uno de los sincronizadores más importantes del sistema circadiano, su desincronización, además de ser el responsable del deterioro del estado fisiológico del bienestar en el individuo mayor (Touitou *et al.*, 1997), también provocará cambios en las funciones inmunológicas (Prinz, 2004). De hecho, se ha descrito que la administración exógena de melatonina puede restablecer los ritmos de la función fagocítica perdidos con la edad, además de conferir una mayor resistencia al estrés oxidativo (Paredes *et al.*, 2007). No sin razón, esta hormona es considerada la molécula cronobiótica más importante del

organismo ya que, siendo generada en el cerebro, actúa como un brazo del reloj circadiano sobre todo el organismo y su funcionalidad (Reiter, 1993). Pese a que su producción es nocturna, durante las primeras horas de la mañana y aproximadamente hasta las 12:00h, persisten unos niveles, aunque descendentes, mayores que los encontrados a partir de las 12:00h, momento en que la cantidad de esta hormona es casi indetectable (Mishima *et al.*, 2001). Esta podría constituir una causa del deterioro inmunitario observado a las 15:00h con respecto a las 10:00h en los sujetos estudiados en la presente tesis. Por otro lado, el ritmo circadiano del cortisol se correlaciona con las variaciones circadianas de diversos parámetros inmunitarios como las proporciones de neutrófilos y subpoblaciones de linfocitos, la linfoproliferación, así como el porcentaje y la actividad de las células NK (Tavadía *et al.*, 1975; McGlone *et al.*, 1991; Kronfol *et al.*, 1997). Dado que con la edad existe una reducción del ritmo diurno del cortisol, así como un aumento menor de sus niveles al despertar (Heaney *et al.*, 2012), la disminución de su amplitud, consecuentemente, también modificará la respuesta del sistema inmunitario con el envejecimiento, como se ha observado en la presente tesis en lo referente a la respuesta linfoproliferativa y la actividad de las células NK.

Otra razón que podría explicar la alteración de los ritmos en las personas mayores es que, debido a la presencia de un mayor estado inflamatorio sistémico con la edad, la "inflamm-aging" ya comentada (Franceschi *et al.*, 2007; De la Fuente y Miquel, 2009), la comunicación bidireccional existente entre el sistema circadiano e inmunitario, donde las citoquinas cobrarían un papel muy importante sobre la modulación del sistema circadiano generado en el NSQ (Coogan y Wyse, 2008), se encontraría alterada con el envejecimiento. Por lo tanto, la inmunosenescencia podría ser responsable, al menos en parte, de la alteración de los ritmos centrales y periféricos, lo que a su vez afectaría a la funcionalidad del sistema inmunitario, pudiéndose generar una espiral viciosa en esos efectos.

Por lo tanto, se podría **concluir** que a lo largo del día existe un deterioro del sistema inmunológico, especialmente en las personas mayores y en los linfocitos. Dado que los parámetros estudiados son marcadores de la velocidad de envejecimiento y de longevidad y que, además, la alteración del sistema circadiano puede contribuir a un envejecimiento prematuro, las modificaciones observadas en la presente tesis durante el día y con la edad, podrían ser uno de los factores que contribuyen a la pérdida de salud y a aumentar la velocidad de envejecimiento de los individuos.



### 5.2.2. Cambios en las funciones de neutrófilos y linfocitos de sangre periférica de adultos y maduros, a lo largo de las distintas estaciones del año

Con el objetivo de determinar los efectos de los ritmos circanuales sobre la funcionalidad de los leucocitos, así como el impacto del envejecimiento sobre los mismo, las tomas de muestra se realizaron a lo largo de las distintas estaciones del año, primavera, verano, otoño e invierno, en dos grupos de edades, adultos (30-49 años) y maduros (60-79 años) del área geográfica de Madrid (40.23°N, 3.43°W), donde las estaciones se encuentran bien diferenciadas.

Los resultados obtenidos en relación a la **adherencia** de los **neutrófilos** muestran unos valores mayores en otoño e invierno con respecto al verano, aumento debido principalmente a los altos niveles observados en los individuos maduros. A su vez, en los **linfocitos** tiene lugar un aumento de dicho parámetro en sujetos maduros durante el invierno. Los adultos sin embargo, no presentaron cambios en este parámetro a lo largo de todo el año.

En cuanto a la **quimiotaxis** de **neutrófilos** y de **linfocitos**, mientras que en los adultos los valores de esta función van, aunque no de forma estadísticamente significativa, en ligero aumento desde primavera hasta invierno, en los maduros presentan una dinámica opuesta. Por ello, en maduros la quimiotaxis de ambos tipos celulares es significativamente menor que en adultos en invierno. Cabe destacar que en la quimiotaxis de linfocitos se aprecia un aumento de sus valores en otoño, aumento que lo mantienen los adultos en invierno, no así los maduros, como ya se ha indicado.

El índice de **fagocitosis** presenta un alto efecto de la estacionalidad, dado que sus valores aumentan tanto en otoño como en invierno en comparación con los obtenidos en primavera y verano en adultos y maduros, pero especialmente en los primeros. Por el contrario la eficacia fagocítica no muestra ninguna modificación a lo largo de las distintas estaciones.

En cuanto al **anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en condiciones basales y estimuladas**, mostró una disminución de sus valores en invierno con respecto al otoño, debido al aumento exacerbado que presentaron los maduros en otoño, siendo mayores que la de los adultos en esa misma estación. Sin embargo, al analizar el *porcentaje de estimulación*, parámetro que

relaciona ambas condiciones (basales y tras estimulación), se observó un aumento en invierno en relación al otoño, especialmente en los individuos maduros.

En la **respuesta linfoproliferativa en condiciones basales**, se observó que los valores estaban aumentados en verano y en otoño, y disminuidos en invierno y en primavera, siendo bastante similares entre adultos y maduros. *En condiciones de estimulación con PHA*, por el contrario, los adultos no presentaron variaciones estacionales en la respuesta proliferativa, mientras que los maduros mostraron unos valores inferiores a la de los adultos en primavera y especialmente en invierno, lo que también se ha observado al analizar *la capacidad de estimulación proliferativa* de los linfocitos.

En lo que respecta a la **actividad citotóxica** de las células NK, en los adultos no se aprecia cambios estacionales. Los individuos maduros sin embargo presentan una disminución de sus niveles a lo largo del año, siendo significativo en invierno con respecto a primavera, y mostrando unos niveles muy por debajo a la de los adultos.

Los efectos de las variaciones circanales sobre parámetros inmunitarios han sido estudiados en lo referente al tamaño y la estructura del timo y del bazo (Vaughan *et al.*, 1987; Mahmoud *et al.*, 1994; Nelson y Demas, 1996; Demas y Nelson, 1998c), y sobre el número de leucocitos circulantes (Dobrowolska y Gromadzka-Ostrowska, 1984; Blom *et al.*, 1994; Mann *et al.*, 2000b) en roedores. Así, se ha observado que el fotoperiodo corto o una duración menor de la luz diaria, lo que es típico del invierno, aumenta el número de neutrófilos y linfocitos en sangre, así como el tamaño y la cantidad de células de estos órganos linfoides, lo que indicaría un fortalecimiento del sistema inmunitario. Sin embargo, prácticamente no existen trabajos que analicen los cambios en la funcionalidad de los leucocitos con las estaciones, especialmente en lo referente a las células fagocíticas, y menos si se considera el efecto de la edad. En primates adultos, se ha descrito una mayor actividad citotóxica de las células NK durante el verano en comparación con el invierno (Mann *et al.*, 2000b). En los resultados obtenidos en la presente tesis se observó también un aumento, aunque no estadísticamente significativo, en los individuos adultos en verano en relación al invierno. Por el contrario, se ha encontrado una dinámica estacional opuesta en la respuesta proliferativa frente a mitógenos, con un aumento en invierno en la edad adulta (Mann *et al.*, 2000a). Sin llegar a diferencias estadísticamente significativas, los resultados de

la presente tesis mostraron una tendencia a una mayor capacidad de respuesta proliferativa, en adultos, en invierno y en primavera que en las otras estaciones del año.

Al analizar a los individuos maduros de nuestro estudio, éstos muestran una actividad citotóxica y una respuesta proliferativa, especialmente en invierno, muy por debajo a la presentada por los sujetos adultos. Este deterioro de las funciones inmunitarias en invierno, podría estar indicando una pérdida de la capacidad de adaptación por parte de los individuos mayores para hacer frente a los "desafíos inmunitarios" que pueden derivarse de diversos estresores ambientales típicos del invierno. Además, algunas funciones de la inmunidad innata, que son compartidas por los neutrófilos y los linfocitos, como la adherencia y la quimiotaxis, aparecen modificadas en otoño y en invierno, con valores mayores en el caso de la adherencia y menores en la quimiotaxis, especialmente en los individuos maduros. Este hecho reforzaría la idea de que los individuos mayores muestran un deterioro de la respuesta inmunitaria, especialmente cuando les sería más necesario un sistema inmunitario bien coordinado para sobrellevar y superar las condiciones adversas. De la misma forma, el aumento de la fagocitosis que presentaron los adultos en otoño e invierno, no lo mostraron los individuos maduros en la misma medida. Por el contrario, en ambas edades se observó un aumento de la producción de  $O_2^-$  en invierno. Si bien en los adultos, este hecho podría deberse a la consecución de realizar un proceso fagocítico más adecuado, acompañando la mayor presencia de ese radical libre a una mayor actividad de fagocitosis, en los maduros podría ser debido a la elevada oxidación que presentan estas células en las personas al avanzar la edad (De la Fuente y Miquel, 2009). Además, en otoño los niveles de  $O_2^-$ , en condiciones basales y estimuladas, en los maduros fueron mucho mayores que en los adultos, lo que podría estar indicando un desajuste en los niveles de oxidantes de los fagocitos cuando las condiciones ambientales comenzarían a ser desfavorables.

Todos estos resultados apoyarían el hecho de que es en la estación invernal cuando el número de procesos infecciosos crece en personas mayores (Alonso-Fernández *et al.*, 2010). Por lo tanto, se podría decir que los maduros, al contrario que los adultos, muestran un deterioro significativo de todos los parámetros de función de los linfocitos, especialmente en invierno, y algunas de las funciones de neutrófilos durante el otoño y el invierno. De hecho, en el único trabajo encontrado sobre los cambios en los ritmos circunuales con el envejecimiento, llevado a cabo en roedores, se observa que el aumento, ya comentado, en

el número de leucocitos sanguíneos, así como la alta cantidad de células del timo y del bazo que aparece en la edad adulta durante el fotoperiodo corto, no lo muestran los animales viejos (Labunets, 2001). Esto también estaría apoyando la idea de una incapacidad de adaptación para hacer frente a épocas adversas en animales viejos, como también ocurre en la funcionalidad leucocitaria de los individuos maduros del presente estudio.

Como ya ha sido mencionado, el fotoperiodo se considera el principal indicador de los animales para sincronizar las épocas de crecimiento y reproducción, y así favorecer su supervivencia (Nelson, 2004). De este modo, a través de la duración del día, en los animales tiene lugar una adaptación fisiológica, que alcanzaría a las distintas funciones de las células inmunitarias, permitiendo la anticipación a los retos estacionales, como el clima adverso y las enfermedades (Yellon *et al.*, 1999). Los cambios en el fotoperiodo influyen sobre el sistema neuroendocrino provocando variaciones en la actividad de los órganos endocrinos como las gónadas, la corteza adrenal, el tiroides y la glándula pineal (Wurtman y Weisel, 1969; Vriend y Lauber, 1973), lo que a su vez influenciaría los componentes del sistema inmunitario. En este sentido, la hormona más estudiada, la melatonina, sincroniza los cambios anuales en el fotoperiodo, por lo que proporciona al organismo un calendario, ya que el curso de su liberación será proporcional a la duración de la noche, obteniendo unos niveles mayores en invierno que en el resto del año (Reiter, 1993). Así, en esta época del año, los animales utilizan la información lumínica a través de los ritmos de la melatonina para anticiparse a los estresores climatológicos, y redirigir la energía para reforzar la respuesta inmunitaria (Nelson, 2004). Esta podría ser una de las razones, al menos en parte, de que en la estación invernal, los individuos adultos del presente estudio hayan mostrado una potenciación de algunos parámetros como la quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos, el índice de fagocitosis, el porcentaje de estimulación de  $O_2^-$  y la capacidad de respuesta proliferativa. De hecho, se ha demostrado que el tratamiento tanto *in vitro* como *in vivo* con melatonina mimetiza los días cortos mejorando las funciones inmunitarias, especialmente las relacionadas con la inmunidad adquirida como la respuesta linfoproliferativa (Nelson y Drazen, 2000). Sin embargo, con el envejecimiento, se observan unos niveles menores de melatonina circulante, debido a una disminución de su liberación y una reducción de su amplitud circadiana. Esto, además de estar implicado en el deterioro del sistema inmunitario (Touitou *et al.*, 1981; Tarquini *et al.*, 1997; Mishima *et al.*, 2001), podría ser una causa de la

incapacidad para mejorar la funcionalidad inmunitaria de las personas mayores durante los fotoperiodos cortos, justo cuando es tan necesaria para afrontar el invierno.

Por otro lado, los ritmos circanuales, al igual que los circadianos, podrían explicar las discrepancias entre estudios sobre inmunosenescencia y sobre otros temas en general, lo que sugiere la necesidad de señalar, en los trabajos científicos, el momento del año en el que se ha realizado una determinada experimentación.

En **conclusión**, las variaciones estacionales promueven cambios en el sistema inmunológico, determinantes para la salud y el bienestar del individuo, que se pierden con el envejecimiento. Es más, con la edad se observa un deterioro de la función inmunitaria, especialmente en invierno, cuando se requeriría una adecuada respuesta inmunitaria con el fin de afrontar unos mayores retos defensivos. Las modificaciones de la funcionalidad de los leucocitos por los ritmos circanuales al avanzar la edad, podrían afectar a la salud y la integridad del individuo, lo que a su vez contribuiría al aumento de la velocidad de envejecimiento.

Con todo lo indicado en este apartado de la presente tesis se enfatiza la necesidad de controlar el momento del día y del año en el que se realiza una analítica o un experimento. La mayoría de los estudios científicos que se llevan a cabo fuera del contexto de la cronobiología, carecen de la información de “cuándo” se ha efectuado una determinada valoración, tanto la hora del día como el periodo del año. Así, cabe la posibilidad de que el origen de muchos resultados contradictorios observados en la bibliografía pueda ser esta consideración cronobiológica. Por consiguiente, el tiempo en sí sería un factor crítico a la hora de valorar e interpretar los resultados, no sólo de la función inmunitaria, sino de todos los parámetros biológicos, revelando la necesidad de estandarizar un horario óptimo para la determinación de tales parámetros y, concretamente, de los inmunitarios. Por lo tanto, en un experimento no sólo sería relevante conocer el *qué* y el *cómo*, también el *cuándo*. Esto tiene una clara aplicación en un contexto tan heterogéneo como lo es el envejecimiento, y especialmente la inmunosenescencia.

### 5.3. ENVEJECIMIENTO SALUDABLE: ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DE PARÁMETROS PLASMÁTICOS DE INFLAMACIÓN Y DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN UNA POBLACIÓN DE HOMBRES Y MUJERES NONAGENARIOS

Los individuos que alcanzan una elevada longevidad, como son los centenarios, poseen una función relativamente intacta del sistema inmunitario (Franceschi *et al.*, 1995; 1996; Cossarizza *et al.*, 1997; Miyaji *et al.*, 2000; Mocchegiani y Malavolta, 2004; Alonso-Fernández *et al.*, 2008). Además, a pesar de que presentan niveles muy elevados de mediadores pro-inflamatorios (Bruunsgaard *et al.*, 1999a; Giuliani *et al.*, 2001; Ferrucci *et al.*, 2005), constituyen el mejor ejemplo de un envejecimiento exitoso, ya que muchos de ellos alcanzan el límite extremo de la vida en buenas condiciones de salud (Cossarizza *et al.*, 1997; Bonafè *et al.*, 2002; Moroni *et al.*, 2005; Galioto *et al.*, 2008). Esta homeostasis preservada del sistema inmunitario podría deberse a los bajos niveles de estrés oxidativo que presentan los centenarios, debido a un balance óptimo entre compuestos oxidantes y defensas antioxidantes (Paolisso *et al.*, 1998; Mecocci *et al.*, 2000; Barbieri *et al.*, 2003; Alonso-Fernández *et al.*, 2008).

Por otra parte, dado el continuo envejecimiento de la población, donde de entre todas las personas ancianas, el número de personas mayores de 85 años se ha doblado en las últimas tres décadas, y se prevé que seguirán creciendo proporcionalmente más en los siguientes años (extraído del Instituto Nacional de Estadística), el estudio de las personas que, sin haber llegado todavía a la edad centenaria, alcanzan una elevada longevidad es clave. Para poder llegar a conocer los posibles mecanismos que se encuentran implicados en el alcance de un envejecimiento exitoso y así ser capaces de promover el mantenimiento de unas condiciones de salud óptimas, las investigaciones en nonagenarios se muestran de gran utilidad. En este sentido, aunque hay algunos trabajos del estado inmunitario de nonagenarios (Mariani *et al.*, 2002; Forsey *et al.*, 2003; Moroni *et al.*, 2005), los conocimientos sobre cómo se encuentra la función de las células inmunitarias y los parámetros relacionados con el estrés oxidativo, en este grupo de personas, son todavía muy escasos.

Por todo ello, el objetivo del presente apartado fue estudiar una serie de funciones del sistema inmunitario de leucocitos de sangre periférica, marcadoras de velocidad de envejecimiento y longevidad, incluyendo la valoración de diversas citoquinas en distintas

muestras biológicas, y algunas defensas antioxidantes en plasma. Se empleó un grupo de nonagenarios, hombres y mujeres, que fue contrastado con dos grupos de distinta edad, adultos (30-49 años) y maduros (60-79 años) o septuagenarios (en el apartado sobre citoquinas), tanto hombres como mujeres, con el fin de comprobar si se asemejaban, al igual que ya se había comprobado para los centenarios (Alonso-Fernández *et al.*, 2008), a las personas adultas en los parámetros arriba citados.

### 5.3.1. Caracterización de las funciones de neutrófilos y linfocitos de mujeres y hombres nonagenarios en comparación con adultos y maduros

En relación a las funciones inmunitarias analizadas en los neutrófilos, los linfocitos y las células NK, los resultados obtenidos al comparar el grupo de individuos maduros (60-79 años) con los adultos (30-49 años) son similares a aquellos pertenecientes al primer objetivo de la presente tesis, y que ya han sido discutidos en su apartado correspondiente (5.1.1.).

Al incluir un grupo de **personas nonagenarias**, los resultados obtenidos en los mismos en lo que respecta a la capacidad de **adherencia** de los leucocitos, tanto de los **neutrófilos** como de los **linfocitos** de sangre periférica, indican que dicha actividad es de un nivel similar al encontrado en los adultos. Por ello, son los maduros los que muestran una mayor adherencia con respecto a los otros dos grupos de edad. No obstante, en algunos trabajos se ha observado que las personas que alcanzan una elevada longevidad presentan un aumento en la expresión de ciertas moléculas de adhesión (Cossarizza *et al.*, 1997; Moroni *et al.*, 2005), lo que se traduciría en un incremento de la adherencia de las células arriba citadas. Esta modulación al alza apuntada en la bibliografía, para moléculas como por ejemplo Mac-1 (CD11b/CD18) en la superficie de los neutrófilos, o CD49d en la de linfocitos, las cuales son necesarias para la extravasación, polarización y migración de estas células, estaría dirigido por mediadores solubles como las citoquinas pro-inflamatorias (Ginaldi *et al.*, 1999). Ya se ha comentado que tales citoquinas están elevadas en centenarios (Bruunsgaard *et al.*, 1999a; Giuliani *et al.*, 2001; Ferrucci *et al.*, 2005), lo que sería un reflejo de la compleja modificación de la red de citoquinas con el envejecimiento. La presencia de mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias tendría como finalidad hacer frente a la pérdida de capacidad de respuesta de las células inmunitarias a un determinado estímulo, o sería el resultado de la mayor necesidad por parte de éstas a señales de activación (Cossarizza *et al.*, 1997). La discrepancia

observada en los resultados de este parámetro en relación a los encontrados por otros autores, posiblemente proceda de las diferencias en la metodología empleada, ya que en el presente estudio no se ha valorado ninguna molécula de adhesión en concreto, únicamente la adherencia general a superficies inorgánicas de nylon. Además, como se ha observado en los resultados de la presente tesis y se discutirá a continuación, los leucocitos de los nonagenarios estudiados muestran una migración óptima y en general una función inmunitaria adecuada, por lo que no sería necesario compensar la falta de respuesta de estas células aumentando la adherencia, como apuntan algunos inmunogerontólogos (Cossarizza *et al.*, 1997). De hecho, cabe destacar que unos niveles demasiado elevados de este parámetro impedirían la migración de las células, ya que se quedarían ancladas sobre la superficie de los tejidos y no alcanzarían la zona del foco infeccioso. Además, en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, y por lo tanto mediante los mismos procedimientos metodológicos, los neutrófilos de los centenarios presentaron una menor adherencia que las personas de 65-75 años de edad, y similares a personas de 25-35 años (Alonso-Fernández *et al.*, 2008), lo que apoyaría la hipótesis de un adecuado mantenimiento de la función inmunitaria en los nonagenarios, al igual que sucede en los centenarios.

En cuanto a los resultados obtenidos en relación a la **quimiotaxis de neutrófilos** y de **linfocitos**, en los nonagenarios se aprecia unos niveles mayores de esta función que en los sujetos maduros, especialmente en los linfocitos, y similares a la de los adultos. La ausencia de deterioro de la quimiotaxis en personas nonagenarias indicaría que éstos son capaces de mantener una adecuada migración de sus leucocitos hacia un estímulo quimioatractivo, al igual que han descrito otros autores en neutrófilos y linfocitos de personas centenarias (Franceschi *et al.*, 1995; 1996; Alonso-Fernández *et al.*, 2008). Cabe destacar que los hombres nonagenarios muestran una semejanza mayor, en cuanto a los niveles de esta función, con los adultos que las mujeres nonagenarias, llegando incluso los valores a ser mayores que los presentados por los linfocitos de los adultos. Este resultado estaría indicando una mejor función quimiotáctica en los hombres nonagenarios que en las mujeres nonagenarias, de la misma forma que han descrito otros autores en personas centenarias, al analizar las diferencias de género (Alonso-Fernández *et al.*, 2008).

En relación a la **capacidad fagocítica** de los neutrófilos, expresada como índice fagocítico y eficacia de la fagocitosis, ambos parámetros muestran unos niveles mayores en



los nonagenarios de ambos sexos que en los individuos maduros, y los valores son semejantes a los presentados por los adultos, siendo, en el caso del índice fagocítico, incluso más elevados que los observados en estos últimos. Los resultados obtenidos parecen indicar que los neutrófilos de los nonagenarios preservan su capacidad de ingerir partículas extrañas, lo que coincide con lo indicado para personas centenarias (Miyaji *et al.*, 2000; Alonso-Fernández *et al.*, 2008). Por su parte, Moroni y colaboradores (2005) observaron una mayor eficacia funcional de los neutrófilos de nonagenarios, los cuales experimentan apoptosis tras la ingestión de microorganismos, evitando así, en cierta medida, la inflamación crónica característica de personas mayores no longevas. Además, estos mismos autores encontraron un mayor contenido de zinc en los neutrófilos de los nonagenarios, lo que se ha postulado como una de las posibles razones del óptimo funcionamiento de estas células en individuos longevos.

Los resultados obtenidos de los niveles intracelulares de **anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )**, en *condiciones basales y estimuladas*, indican que, a diferencia de los individuos maduros, los nonagenarios, tanto los hombres como las mujeres, tienen dichos niveles semejantes a los de los sujetos adultos. Esta ausencia de variación con respecto a la edad adulta también ha sido observado en sujetos centenarios (Alonso-Fernández *et al.*, 2008), hecho que podría ser debido, en parte, a la mayor actividad de la enzima SOD descrita en los neutrófilos de personas longevas (Moroni *et al.*, 2005), lo que estaría relacionado con una menor posibilidad de oxidación en estos sujetos. Por otro lado, el *porcentaje de estimulación* de  $O_2^{\cdot-}$  que se obtiene de la relación entre la condición estimulada y basal, no ha presentado diferencias significativas en los tres grupos de edad estudiados, lo que indicaría una ausencia de variaciones en la capacidad microbicida de los neutrófilos al aumentar la edad. Si bien este resultado no era de esperar, la elevada producción de  $O_2^{\cdot-}$  en condiciones estimuladas observada en los maduros, ha dado lugar, en términos cuantitativos, a que estos individuos muestren una capacidad inalterada en relación a los adultos y los nonagenarios.

En cuanto a la **actividad citotóxica** de las células NK, los resultados indican una disminución en los niveles de esta actividad en las personas maduras en relación a las adultas, disminución que es menor en los nonagenarios, observando unos niveles en los hombres de esta edad prácticamente similares a los mostrados por los adultos. Este parámetro, que ha sido considerado como un buen marcador de estado de salud (Myśliwski

*et al.*, 1993), muestra unos niveles preservados en individuos centenarios, manteniendo, así, la capacidad de eliminar células infectadas o tumorales tan eficazmente como las personas jóvenes (Cossarizza *et al.*, 1997). En un estudio realizado en una población de un amplio rango de edades, si bien no encontraron una disminución estadísticamente significativa de esta actividad con la edad, los sujetos de 80-100 años presentaron unos niveles ligeramente aumentados de la misma (Le Garff-Tavernier *et al.*, 2010). A pesar de la inevitable diversidad en el estado de salud de los sujetos analizados en el presente estudio y en otros sobre individuos longevos, lo que puede conducir a resultados ligeramente contradictorios, la literatura sobre la actividad NK de los individuos longevos muestra, invariablemente, que dicha capacidad tiene mejores niveles que en personas mayores no longevas. De hecho, se ha descrito que las células NK de los nonagenarios mantienen la capacidad de responder a estímulos como IL-12 e IL-2, y también de sintetizar ciertas quimioquinas, como IL-8, indispensables para una correcta comunicación inmunitaria (Mariani *et al.*, 2002).

En relación a la **capacidad proliferativa** de los linfocitos, en presencia del mitógeno PHA, los nonagenarios muestran unos niveles más parecidos a los presentados por los individuos adultos que a los de los maduros. Cabe destacar que, en las mujeres maduras esta función presenta una disminución abrupta, situación que no se observa, al menos estadísticamente, en las nonagenarias. Por su parte, en los hombres, a pesar de que presentan una dinámica similar a las mujeres a lo largo de los tres rangos de edad estudiados, estas diferencias no son significativas. En centenarios, diversos autores han observado una capacidad proliferativa preservada de los linfocitos (Franceschi *et al.*, 1995; 1996). De hecho, los linfocitos activos de los centenarios, a diferencia de las personas mayores no longevas, parecen ser capaces de unir y responder a IL-2 de una manera efectiva (Cossarizza *et al.*, 1997), lo que favorecería una proliferación óptima de estas células. Así, los nonagenarios analizados en el presente estudio también presentarían, en mayor medida que los individuos maduros, esta característica, que además estaría avalada por el hecho de que estos individuos muestran una liberación preservada de IL-2 por las células mononucleares, y concretamente por los linfocitos T, como se ha comprobado en la presente tesis y se discutirá más adelante.

Por lo tanto, como **conclusión parcial** se podría indicar que, en general, los individuos nonagenarios no presentan unos valores en las funciones inmunitarias estudiadas esperables

por el envejecimiento “normal” del sistema defensivo, ya que el mismo muestra características funcionales mejores que las de las personas de 60-79 años, e incluso parecidas a los de los adultos de 30-49 años de edad. Así, los nonagenarios podrían representar una población de personas que mantienen, al menos parcialmente, una inmunidad innata y adaptativa eficiente, o menos deteriorada que las personas de 60-79 años de edad.

### **5.3.2. Caracterización de los niveles de citoquinas secretadas en diversas localizaciones biológicas de mujeres y hombres nonagenarios en comparación con adultos septuagenarios**

A pesar de los mecanismos inmunitarios preservados y eficaces que presentan los centenarios, éstos también se encuentran afectados por el “inflamm-aging” al igual que las personas mayores no longevas. Es más, los centenarios poseerían los mayores niveles de las típicas citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en relación a edades menores, lo que ha llevado a plantear la posibilidad del papel beneficioso de las citoquinas pro-inflamatorias en edades muy avanzadas (Cossarizza *et al.*, 1997; Bruunsgaard *et al.*, 1999a; Miyaji *et al.*, 2000; Giuliani *et al.*, 2001; Forsey *et al.*, 2003; Ferrucci *et al.*, 2005; Moroni *et al.*, 2005). Si bien algunos de estos trabajos aquí citados también han considerado el análisis de personas nonagenarias, cuyos niveles de citoquinas pro-inflamatorias también serían muy elevados, son pocos los estudios al respecto, y menos si se considera el análisis de hombres y mujeres por separado.

Por otro lado, son numerosos los trabajos contradictorios que presenta la bibliografía en cuanto a los niveles de citoquinas y sus cambios a lo largo del envejecimiento, debido a la innumerable cantidad de variables que pueden estar interfiriendo, como ya ha sido comentado en el apartado 5.1.2. Así, el origen y procesamiento de la muestra biológica, y la metodología empleada para desencadenar una respuesta inmunitaria, entre otros, son factores que pueden provocar resultados distintos y contradictorios a la hora de valorar una misma citoquina, aspecto que se discutirá en el presente apartado.

En lo que respecta a los niveles de citoquinas en el **sobrenadante de cultivo de células mononucleares o PBMCs en presencia de PHA**, las diferencias en los resultados de las

citoquinas **IL-2**, **IL-6**, **TNF- $\alpha$**  e **IL-8** de los sujetos septuagenarios con respecto a los adultos concuerdan, en general, con los obtenidos y discutidos en el primer objetivo de la presente tesis (apartado 5.1.2.). No obstante, en muchos de los casos se observa una pérdida en el grado de significación estadística entre los grupos experimentales, probablemente debido al menor tamaño de la muestra empleada en el presente apartado. Sin embargo, los niveles de **IL-1 $\beta$**  aparecen disminuidos en los septuagenarios frente a los adultos, al contrario de lo obtenido en el primer objetivo, donde sus niveles no variaban con la edad, e incluso mostraban una tendencia al aumento. Esta aparente contradicción podría ser debida a los distintos rangos de edad empleados, 60-79 años en el primer objetivo y 70-79 años en el presente apartado. Así, las personas septuagenarias mostrarían una menor capacidad, en relación a edades inferiores, de mantener unos niveles de liberación de IL-1 $\beta$  parecidos a los adultos.

Por otro lado, en los **individuos nonagenarios** los niveles de **IL-2** e **IL-1 $\beta$**  valorados en el sobrenadante de PBMCs en presencia de PHA, en general, son similares a los de los adultos. El mantenimiento de los niveles de IL-2 podría ser una de las razones por la cual los nonagenarios no presentan una disminución de la capacidad proliferativa, típica del envejecimiento. Además, dado que un patrón de respuesta inmunitaria caracterizado por una baja proliferación y producción de IL-2, junto con otros parámetros inmunológicos, se ha propuesto como predictor de una subsecuente mortalidad (Wikby *et al.*, 2002), los niveles preservados de linfoproliferación y de liberación de IL-2 por las células mononucleares de los nonagenarios analizados en la presente tesis, avalarían el que esas personas hayan podido alcanzar su elevada longevidad. Por otro lado, otros autores también han observado unos niveles elevados de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes de células mononucleares de personas centenarias tras un estímulo mitogénico (Cossarizza *et al.*, 1997).

En lo que respecta a los resultados obtenidos en los niveles de **IL-6**, **TNF- $\alpha$**  e **IL-8**, los nonagenarios muestran unos niveles distintos en función del género. Mientras que en las mujeres nonagenarias tiene lugar una disminución de los valores de estas tres citoquinas con respecto a las adultas, los hombres muestran unos valores semejantes a los adultos, e incluso mayores que éstos en el caso del TNF- $\alpha$ . Así, los hombres nonagenarios presentan unos niveles mayores de las tres citoquinas que las mujeres de su misma edad. Cabe destacar que si bien otros autores aprecian unos niveles elevados de **IL-6** y **TNF- $\alpha$**  en el

sobrenadante de células mononucleares de personas centenarias, no se ha encontrado ningún estudio donde valoren estas citoquinas diferenciando hombres y mujeres, aunque estos trabajos sí han descrito una gran dispersión en los datos obtenidos (Cossarizza *et al.*, 1997). Por tanto, esa gran variabilidad en los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  podría ser debida, al menos en parte, a la distinta dinámica observada en ambos sexos, lo que va a suponer una gran variabilidad al aunar los resultados de hombres y mujeres. Alberti y colaboradores (2006) observaron un menor porcentaje de células CD4+ activas/memoria (CD95+CD28+) positivamente marcadas para TNF- $\alpha$  en un grupo de individuos de 76 años de edad media en relación a los jóvenes, disminución que no presentaban las personas nonagenarias. En el caso de la **IL-8**, algunos autores describen un incremento más evidente de sus niveles al estimular linfocitos T de nonagenarios que de personas jóvenes (Mariani *et al.*, 2001). Sin embargo, pese a que los hombres nonagenarios de la presente tesis muestran niveles similares a los adultos, en las mujeres nonagenarias dichos niveles disminuyen. La principal función de esta citoquina es promover la movilización de los neutrófilos a las zonas de inflamación, función que, como se ha discutido anteriormente, no se encuentra deteriorada en los hombres nonagenarios y sí en las mujeres, aunque en menor medida que en las septuagenarias. Esta quimiotaxis de neutrófilos podría ser consecuencia de los niveles de IL-8. Sin embargo, es difícil establecer la relación causa/consecuencia entre ambos parámetros, teniendo en cuenta además, que otra célula inmunitaria, el neutrófilo, es el principal productor de la IL-8, hecho que se discutirá más adelante.

Una dilución del sobrenadante de células mononucleares estimuladas con PHA 1:4 no fue suficiente para la determinación de los niveles de **IL-10** en la mayoría de las muestras, ya que la fluorescencia emitida por las mismas sobrepasó la curva patrón proporcionada por el kit comercial. Dado que todas las muestras procedentes de mujeres adultas excedieron a la concentración máxima de detección, y a edades mayores se pudieron detectar más valores, se podría sugerir que los niveles de IL-10 en este tipo de muestra disminuyen con la edad. Sin embargo, ninguna de las muestras de los hombres nonagenarios entró en la curva patrón. Así, los hombres parece que podrían seguir una cinética diferente a la de las mujeres, al igual que en las citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8. Se puede sugerir que mientras que en las mujeres los niveles de IL-10 disminuirían a lo largo de las edades estudiadas, los hombres mantendrían unos niveles más elevados, parecidos a las mujeres adultas.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en los niveles de las citoquinas valoradas en el sobrenadante de células mononucleares en presencia de PHA, mitógeno específico de linfocitos T, muestran, en general, unos niveles similares entre los individuos nonagenarios y adultos, especialmente en los hombres, y disminuidos en los septuagenarios. Esto sugeriría un mantenimiento de la capacidad de secreción de citoquinas de los linfocitos T de los nonagenarios, mientras que los linfocitos T de las personas septuagenarias mostrarían un deterioro en dicha liberación.

El factor género parece ser una variable a tener muy en cuenta a la hora de estudiar individuos longevos, aspecto en el que se profundizará en la discusión general (apartado 5.3.4.).

En cuanto a los niveles de citoquinas en el **plasma o sobrenadante de sangre completa en ausencia/presencia de una estimulación previa con LPS**, en general, con el envejecimiento tiene lugar un aumento de los niveles de **IL-2**, en ambos tipos de muestra, desde la edad adulta hasta la nonagenaria, tanto en hombres como en mujeres. Sin embargo, al analizar la proporción o ratio de IL-2 liberada, obtenida de la relación entre los dos tipos de muestra y siendo el valor de la muestra sin estímulo 1, los adultos y los nonagenarios, hombres y mujeres, presentan niveles parecidos, los cuales se encuentran entre 0 y 1. Esto significa que en condiciones estimuladas se detectan menores niveles de IL-2 que en ausencia de estímulo. Por el contrario, los septuagenarios muestran, en condiciones estimuladas, niveles 2-3 veces mayores de esta citoquina que en condiciones basales. Sin embargo, si bien la literatura sobre los niveles de IL-2 en estimulaciones *in vitro* con mitógenos específicos de linfocitos T es extensa, al ser una citoquina producida por estas células, y caracterizada por ser un factor de crecimiento de las mismas, como ya se ha discutido anteriormente, no es así cuando el estímulo empleado es el LPS. En este sentido no se ha encontrado ningún trabajo que analice esa secreción de IL-2. La elevada liberación de esta citoquina, en términos de “ratio”, encontrada en los septuagenarios, podría corresponder a una desregulación en su producción/liberación, con el fin de intentar promover una mejor respuesta proliferativa, y/o en el menor consumo de esta citoquina debido a la alteración cuantitativa y/o cualitativa del receptor de IL-2 sobre la superficie de los linfocitos de las personas septuagenarias (Gillis *et al.*, 1981; Nagel *et al.*, 1988), compensación que los nonagenarios no necesitarían llevar a cabo.

Los resultados sobre los niveles de **IL-1 $\beta$**  en el plasma de sangre completa en ausencia/presencia de una estimulación previa con LPS indican, en general, un aumento de los niveles de esta citoquina a edades mayores. Algunos autores describen una correlación positiva entre la edad y la liberación y/o producción espontánea intracelular de IL-1 $\beta$  en monocitos, principal célula productora de esta citoquina (Sadeghi *et al.*, 1999; Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012), así como una mayor producción/liberación de la misma en presencia de LPS (Riancho *et al.*, 1994; Müller-Alouf *et al.*, 1994; Rink *et al.*, 1998; Gabriel *et al.*, 2002; Pietschmann *et al.*, 2003). Cabe destacar que, en ausencia de estímulo, los septuagenarios presentan los mayores niveles basales de IL-1 $\beta$ , mientras que los nonagenarios presentarían menores niveles, e incluso parecidos a los adultos en el caso de las mujeres. El análisis de la proporción de IL-1 $\beta$  liberada, el “ratio” IL-1 $\beta$ , muestra que los adultos y los septuagenarios secretan la misma proporción de dicha citoquina, esto es, 2-4 veces más frente al LPS que en condiciones basales. Los nonagenarios, sin embargo, liberan 7-10 veces más IL-1 $\beta$ . De hecho, Miyaji y colaboradores (2000) apuntaron que los granulocitos, neutrófilos en su mayoría, que más IL-1 $\beta$  liberaban eran los que pertenecían al grupo de centenarios sanos, en relación a sujetos de 42-64 años de edad y a centenarios no sanos, lo que podría indicar un papel beneficioso de esta citoquina pro-inflamatoria ante situaciones de un reto inmunitario en edades avanzadas.

En cuanto a los niveles de **IL-6** en el plasma procedente de sangre completa estimulada previamente en ausencia/presencia de LPS, los resultados muestran un aumento muy significativo de sus valores con el envejecimiento en ambos sexos, especialmente en condiciones basales. De hecho, son muchos los autores que describen un aumento de la producción de esta citoquina pro-inflamatoria con la edad en ausencia de estímulo (Sadeghi *et al.*, 1999; Gabriel *et al.*, 2002). Tras la estimulación con LPS, sin embargo, dicho aumento no aparece ser significativo en las mujeres de 70-79 años, y sí en los hombres de esta misma edad, lo que estaría de acuerdo con lo obtenido en los resultados del primer objetivo de la presente tesis. Los nonagenarios, tanto hombres como mujeres, muestran unos mayores niveles que los adultos, e incluso que los septuagenarios. Sin embargo, al analizar la proporción de IL-6 liberada entre ambas condiciones, los adultos y los nonagenarios secretan niveles parecidos; unas 100 veces más las mujeres y unas 200 veces más los hombres. Sin embargo, los septuagenarios liberan proporcionalmente más IL-6, entre 250 y 300 veces

más, en mujeres y hombres, respectivamente, aunque estos mayores niveles no fueron estadísticamente significativos en relación a las otras edades. Por lo tanto, los nonagenarios liberarían, proporcionalmente, cantidades similares a las de los adultos de IL-6, valores que serían inferiores a los presentados por los septuagenarios. De hecho, se ha descrito que aquellos individuos genéticamente predispuestos a producir elevados niveles de IL-6 durante el envejecimiento, poseen una menor probabilidad de alcanzar una elevada longevidad (Bonafè *et al.*, 2001).

En relación a los niveles de **TNF- $\alpha$**  valorados en el plasma de sangre completa estimulada previamente en ausencia/presencia de LPS, los resultados indican, en general, un aumento de sus niveles al avanzar la edad en ambos tipos de muestra. Cabe destacar que, en ausencia de cualquier estímulo, los septuagenarios, tanto hombres como mujeres, presentan unos niveles mayores que los adultos, al igual que indican otros autores (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012). Este aumento no se apreció tan claramente en los resultados del primer objetivo de la presente tesis, donde se comparaban personas de 60-79 años y 30-49 años de edad. Sin embargo, en este apartado, al haber empleado sujetos de 70-79 años, podría haber dado lugar a unas diferencias más claras en los niveles de TNF- $\alpha$  entre los distintos rangos de edad. En cuanto a la comparación entre los nonagenarios y los adultos, mientras que en las mujeres nonagenarias se aprecian unos niveles mayores de TNF- $\alpha$  en ausencia de estímulo, los hombres presentan niveles parecidos en ambas edades. En presencia de LPS, el grupo de nonagenarios es el que muestra un mayor y más significativo aumento de TNF- $\alpha$ . Estos altos niveles podrían proceder de los fagocitos, ya que Sandmand y colaboradores (2003) demostraron que los linfocitos T no estaban implicados en los altos niveles de esta citoquina en personas centenarias, al contrario que los sujetos de unos 81 años de edad media, cuyos linfocitos eran los principales responsables de su elevada secreción. En relación a la proporción de TNF- $\alpha$  liberada, los adultos y los septuagenarios secretaron niveles parecidos de esta citoquina, unas 20-40 veces más que en condiciones basales. Los nonagenarios, sin embargo, liberaron 90 veces más citoquina en respuesta a LPS. Cabe destacar que con el envejecimiento, se ha descrito un aumento en la capacidad de producción de TNF- $\alpha$  por algunas células inmunitarias, como son los fagocitos, tanto monocitos como neutrófilos, así como un incremento en el porcentaje de leucocitos que producen mayores niveles de esta citoquina, como los linfocitos T $\gamma\delta$ , todo lo cual podría



contribuir a los elevados niveles de TNF- $\alpha$  y al ambiente de inflamación característico de personas mayores y que los centenarios también presentarían en mayor medida (Colonna-Romano *et al.*, 2002; Argentati *et al.*, 2002; Sandmand *et al.*, 2003; De la Fuente y Miquel, 2009), al igual que los nonagenarios analizados en la presente tesis. Sin embargo, las evidencias parecen indicar un papel beneficioso de las citoquinas pro-inflamatorias en edades avanzadas (Miyaji *et al.*, 2000; Biggelaar *et al.*, 2004b). De hecho, se ha observado que los leucocitos de centenarios sanos que no toman medicinas ni requieren de cuidados especiales, producen, tras un estímulo, más cantidades de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que los centenarios no sanos que se caracterizan por ser dependientes y necesitar cuidados diarios (Miyaji *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos de los niveles de IL-8 en el plasma de sangre completa en ausencia de estímulo muestran un aumento muy significativo a mayor edad, tanto en hombres como en mujeres, aunque en términos estadísticos, estos mayores niveles son más significativos en las personas septuagenarias que en las nonagenarias. Tras una estimulación con LPS, sin embargo, es únicamente en las mujeres nonagenarias donde tiene lugar un aumento altamente significativo de los niveles de IL-8 en relación a las adultas, mientras que en los hombres, dicho aumento se aprecia en los septuagenarios, siendo los valores en los nonagenarios similares a los adultos. Esta citoquina quimioatrayente para los neutrófilos, cuyo principal productor son los propios neutrófilos, pero también la pueden generar monocitos y células NK, es el activador más importante y agente antiapoptótico de los neutrófilos durante la inflamación (Bazzoni *et al.*, 1991; Mukaida, 2000). Son varios los autores que describen unos mayores niveles de IL-8 con el envejecimiento, tanto en ausencia de estímulo como en presencia de LPS, en cultivos de sangre completa y de neutrófilos purificados (Rink *et al.*, 1998; Gabriel *et al.*, 2002; Dalboni *et al.*, 2013). Por el contrario, en cultivos de monocitos purificados y células mononucleares, en condiciones basales como estimuladas con LPS, las personas mayores de 65 años liberan menos IL-8 que los jóvenes (Clark y Peterson, 1994; Sadeghi *et al.*, 1999). Esto apuntaría a los neutrófilos como los principales responsables de la sobreproducción de IL-8 con la edad. Además, se ha comprobado que con el envejecimiento existen alteraciones en los receptores responsables de la funcionalidad de los neutrófilos, así como una disminución en los cambios funcionales a través de las señales desencadenadas por estos receptores específicos, como CXCR1,

receptor de unión de IL-8 (Dalboni *et al.*, 2013). Esta unión de gran afinidad desencadena señales transmembrana que juegan un papel importante en muchas funciones antimicrobianas incluyendo la quimiotaxis, la degranulación y el estallido oxidativo. De hecho, se ha detectado una menor expresión de CXCR1 en los neutrófilos al avanzar la edad. La función de las quimioquinas en promover y modular la migración leucocitaria es esencial para una rápida y eficaz respuesta inflamatoria y en la defensa del hospedador contra infecciones (Pulsatelli *et al.*, 2000). De hecho, la literatura describe un aumento de varias quimioquinas, además de IL-8, hasta en grupos de personas mayores de 96 años de edad (Pulsatelli *et al.*, 2000). Esto podría estar indicando un mecanismo compensatorio frente al deterioro observado con la edad, en el receptor de IL-8, CXCR1, y en ciertas funciones inmunitarias, como las implicadas en el proceso fagocítico. Además, se ha comprobado que la estimulación permanente por IL-1 $\beta$ , citoquina que se encuentra en grandes cantidades, como ya se ha discutido anteriormente, puede causar una elevada producción de IL-8 por los neutrófilos de personas de edades avanzadas (Gabriel *et al.*, 2002). Cuando se analiza la proporción de IL-8 secretada al medio entre ambas condiciones, estimulada y no estimulada, tanto las mujeres adultas y septuagenarias como los hombres adultos liberan cantidades de IL-8 similares, unas 10 veces más que en condiciones basales. Por el contrario, las mujeres nonagenarias y los hombres septuagenarios liberan unas 20 veces más IL-8 que en condiciones sin estimulación, y 25 veces más los hombres nonagenarios, lo que reflejaría el mecanismo compensatorio antes mencionado, resultando en una elevada quimiotaxis de neutrófilos, parámetro previamente comentado para estos sujetos y discutido en el apartado 5.3.1.

En cuanto a los niveles obtenidos de **IL-10** en el plasma de sangre completa en ausencia de estímulo, los resultados indican, en general, un aumento de sus valores con la edad, si bien los nonagenarios presentan un incremento menor, e incluso inexistente en las mujeres nonagenarias, siendo así sus niveles similares a los de las adultas. Tras la estimulación con LPS, los adultos y los nonagenarios muestran valores similares de IL-10, mientras que en los septuagenarios se encuentran aumentados. Sin embargo, este incremento no posee un valor estadísticamente significativo, al igual que sucedió al comparar los sujetos adultos y maduros del primer objetivo de la presente tesis. El análisis de la proporción de IL-10 secretada al plasma revela que las mujeres adultas y nonagenarias son capaces de liberar 6

veces más IL-10 en condiciones de estimulación, mientras que las septuagenarias sólo secretarían 2 veces más citoquina. Sin embargo, en los hombres no se han observado variaciones en la proporción de esta citoquina liberada con la edad, siendo en todos ellos unas 2-4 veces mayor que en condiciones basales. Son varias las células inmunitarias descritas que refieren un aumento en la producción de IL-10 a mayor edad, como son los neutrófilos y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Kurashima y Utsuyama, 1997; Rink *et al.*, 1998; Dalboni *et al.*, 2013). Sin embargo, en términos relativos, la capacidad real de producir/liberar IL-10 se encontraría muy deteriorada en individuos septuagenarios, no así en los nonagenarios, los cuales parecen mantener los niveles de personas adultas, especialmente las mujeres, confiriendo así protección frente a los elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias.

Los elevados niveles de las **citoquinas pro-inflamatorias** IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8 liberados por las células inmunitarias de los nonagenarios en presencia de LPS, indican que la producción/liberación de estas tres citoquinas se encuentra exacerbada, incluso en mayor medida que en individuos septuagenarios. Gabriel y colaboradores (2002) describieron un aumento de estas citoquinas en personas de 70-90 años que cumplían el protocolo SENIEUR, cuya finalidad sería compensar la deteriorada inmunidad celular observada con el envejecimiento. Así, el aumento en la secreción de estas citoquinas apuntado en el presente estudio en nonagenarios, cuyas principales productores son los monocitos y neutrófilos, podría constituir un mecanismo compensatorio llevado al extremo en personas de edades avanzadas, con el fin de mantener y promover una adecuada comunicación celular. De hecho, otros autores también han observado unos niveles muy elevados de citoquinas pro-inflamatorias en centenarios, y especialmente en aquellos con unas condiciones de salud óptimas (Miyaji *et al.*, 2000), lo que lleva a plantear la posibilidad de un papel beneficioso de estas citoquinas en personas de edad avanzada. Van den Biggelaar y colaboradores (2004b) expusieron que aquellos individuos mayores de 85 años que producían, tras una estimulación con LPS, bajos niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 mostraban un riesgo dos veces mayor de morir, ya que esta baja capacidad de producción de citoquinas conferiría un mayor riesgo de perder la capacidad a responder apropiadamente a señales dañinas.

Por otro lado, como parte de las **redes anti-inflamatorias**, las personas nonagenarias, y especialmente las mujeres, muestran una elevada liberación de IL-10, posiblemente con el objetivo de contrarrestar los elevados niveles secretados de las citoquinas pro-inflamatorias

antes mencionadas, cuyas cantidades son superiores a las presentadas por los hombres nonagenarios. Esto nos lleva a plantear que las mujeres que alcanzan una gran longevidad, si bien son más proporcionalmente en número que los hombres, llegan en peores condiciones de salud (Austad, 2006; Eskes y Haanen, 2007). Así, pese a que son menos los hombres que alcanzan una elevada longevidad, éstos estarían mejor en términos de salud (Alonso-Fernández *et al.*, 2008), lo que podría ser una de las razones de por qué las mujeres nonagenarias analizadas requieren niveles elevados de producción/liberación de IL-10, similares a los adultos, mientras que los hombres nonagenarios no.

En cuanto a los resultados sobre los niveles en **plasma** de las distintas citoquinas valoradas en la presente tesis, los niveles de **IL-2**, en los hombres, no muestran variaciones con la edad. En las mujeres septuagenarias, sin embargo, tiene lugar un aumento muy significativo, mientras que las nonagenarias mantienen niveles similares a las adultas. Apenas se han encontrado trabajos donde valoren esta citoquina en plasma. Myśliwska y colaboradores (1998) no observaron ninguna variación en los niveles séricos de esta citoquina entre un grupo de sujetos de 63 años y 30 años de edad media. Este resultado concuerda con lo obtenido en los hombres septuagenarios, pero no en las mujeres. Sin embargo, en este estudio citado, no analizan ambos sexos por separado, ni indican información sobre la proporción de hombres y mujeres empleados.

Los resultados obtenidos en los niveles de **IL-1 $\beta$**  en plasma muestran un aumento en el grupo de septuagenarios frente a los adultos, incremento que los nonagenarios, tanto hombres como mujeres, no presentan. De hecho, éstos últimos muestran unos niveles parecidos a los adultos. Pese a que algunos autores indican que esta citoquina no es detectable en plasma (Catania *et al.*, 1997), otros describen un aumento progresivo de esta citoquina con la edad, hasta los 60 años (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012), y una ausencia de diferencias entre hombres y mujeres (Ferrucci *et al.*, 2005), al igual que se ha observado en la presente tesis. Sin embargo, no se ha encontrado ningún trabajo en el que se valore IL-1 $\beta$  en edades avanzadas. Por otro lado, cabe destacar que no toda la citoquina presente en el plasma procedería de la producción leucocitaria, ya que el tejido adiposo también puede ser origen de la misma (Coppack, 2001). Es más, con la vejez la masa grasa aumenta significativamente, y los adipocitos producen más citoquinas pro-inflamatorias e inducen

una mayor respuesta inflamatoria en otras células, como en los macrófagos peritoneales (Wu *et al.*, 2007; Cartier *et al.*, 2009).

En cuanto a los niveles plasmáticos de **IL-6**, los resultados obtenidos muestran, en las mujeres, un aumento significativo con la edad, desde la edad adulta hasta la nonagenaria, hecho que no se observó en los hombres. Estos resultados en personas septuagenarias *versus* adultas no coincidirían plenamente con aquellos obtenidos en el primer objetivo de la presente tesis. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, dada la gran controversia en los niveles de esta citoquina con la edad debido a la influencia del estado de salud y diversos factores externos sobre sus niveles (Cohen *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 2006), el hecho de haber empleado otro grupo de individuos, ha podido dar lugar a esta falta de coincidencia. Es más, son muchos los estudios que apoyan el resultado obtenido en los niveles plasmáticos de IL-6 del presente apartado, es decir, un incremento significativo en las mujeres, donde jugaría un papel relevante la pérdida de los estrógenos, y una ausencia de diferencias en los hombres (Beharka *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2012). Al considerar los estudios llevados a cabo, en este sentido, en personas nonagenarias y centenarias, se apreció en las mismas un aumento significativo de esta citoquina en relación a edades inferiores (Bruunsgaard *et al.*, 1999a; Forsey *et al.*, 2003; Moroni *et al.*, 2005). El aumento en la concentración de IL-6 con la edad, incluso en personas mayores de 70 años, podría estar reflejando una incapacidad funcional (Cohen *et al.*, 1997). A este respecto, cabe destacar que dicho incremento tiene lugar en menor medida en las personas nonagenarias estudiadas en la presente tesis que en las maduras, lo cual podría indicar un mejor estado funcional de las primeras. No obstante, otros investigadores no han encontrado diferencias entre individuos de 91 y 78 años de edad media (Kaszubowska *et al.*, 2011). Por otro lado, la fuente de esta citoquina valorada en el plasma no tiene porqué ser únicamente la procedente de la producción leucocitaria, como ya se ha comentado anteriormente para otras citoquinas presentes en el plasma, siendo las células endoteliales, el tejido adiposo y el músculo, entre otras, fuentes importantes de IL-6 y más activas con la edad en su liberación (Belmin *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 2001; Coppack, 2001; Wu y Meydani, 2008; Cartier *et al.*, 2009).

Los resultados sobre el **TNF- $\alpha$**  plasmático muestran, en general, unos mayores niveles de esta citoquina en los septuagenarios con respecto a los adultos, en hombres y mujeres.

Mientras que los nonagenarios muestran unos valores más parecidos a los adultos, especialmente en el caso de los hombres. Son numerosas las investigaciones que apuntan a una correlación positiva de esta citoquina en el plasma con la edad (Haack *et al.*, 1999; Bruunsgaard *et al.*, 2000b), así como a una ausencia de diferencias entre hombres y mujeres en estudios llevados a cabo en amplios rangos de edad, 20-102 y 63-96 años (Ferrucci *et al.*, 2005; Mariani *et al.*, 2006). En 2011, Kaszubowska y colaboradores no sólo detectaron un aumento significativo de esta citoquina en un grupo de hombres y mujeres de 76 años de edad media, sino que también lo observaron en nonagenarios. Sin embargo, todos los nonagenarios reclutados en el estudio citado fueron mujeres, lo cual estaría de acuerdo con lo obtenido en la presente tesis. De hecho, otros estudios que también indican un aumento de TNF- $\alpha$  en el plasma de personas centenarias, emplean proporcionalmente muchas más mujeres que hombres (Sandmand *et al.*, 2003), lo que podría enmascarar la ausencia de diferencias en los hombres longevos, como se ha observado en la presente tesis. Sin embargo, al igual que ocurre con otras citoquinas, los niveles detectados de TNF- $\alpha$  en plasma pueden proceder de otras células no leucocitarias, como los adipocitos, cuya actividad a la hora de producir TNF- $\alpha$  aumenta al envejecer (Belmin *et al.*, 1995; Morin *et al.*, 1997; Coppack, 2001; Wu y Meydani, 2008; Cartier *et al.*, 2009).

En cuanto a los niveles en plasma de **IL-8**, los resultados muestran, en general, un aumento de sus valores a lo largo de todas las edades estudiadas, observándose un especial incremento en las mujeres nonagenarias. Mariani y colaboradores (2006) también detectaron unos mayores niveles plasmáticos de esta citoquina en mujeres y hombres de 63-96 años, los cuales aumentaban progresivamente dentro de este rango de edad.

Los resultados obtenidos en la **IL-10** plasmática presentan unos niveles aumentados en los septuagenarios con respecto a los adultos; mientras que los nonagenarios mantienen unos valores similares a los observados en los adultos, tanto en hombres como en mujeres. De la misma forma, otros autores han detectado un incremento en los niveles plasmáticos de esta citoquina en personas de 70 años de edad media con respecto a edades más jóvenes (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012). Sin embargo, no se ha encontrado ningún trabajo con los niveles plasmáticos de esta citoquina en personas longevas.

La valoración de las citoquinas circulantes aportaría una información sistémica de la totalidad del organismo, ya que pueden tener muy diversas procedencias además de la

leucocitaria. Es más, con el envejecimiento, algunas células que no pertenecen al sistema inmunitario, aumentan la producción de ciertas citoquinas pro-inflamatorias, como ya se ha comentado previamente. Por lo que su determinación en el plasma o suero, una muestra típicamente utilizada para la valoración de citoquinas, no sería muy adecuada para conocer los cambios que el sistema inmunitario experimenta en su perfil de citoquinas con la edad, aunque sí sería representativa del envejecimiento del organismo en general. Así, los resultados obtenidos en la presente tesis indican una preservación, en los nonagenarios en relación a los adultos, de los niveles de las citoquinas IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 en hombres y mujeres, aunque especialmente en los primeros, lo que podría estar indicando un mejor control de los procesos inflamatorios y unas condiciones de salud preservadas en los nonagenarios.

Uno de los aspectos que hay que destacar sobre los resultados de las citoquinas es que en función de la procedencia de la muestra en la que se estudie, sus niveles evolucionan de manera diferente con la edad. Así, en el **plasma obtenido de sangre incubada previamente en ausencia/presencia de LPS** se observa un aumento de IL-2, y también de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , desde la edad adulta hasta la nonagenaria. Sin embargo, estas mismas citoquinas, en los **sobrenadantes de cultivo de células mononucleares estimuladas con PHA** presentan, en general, unos niveles menores en personas septuagenarias, mientras que en los individuos nonagenarios son similares a los de los adultos. Por su parte, los **niveles plasmáticos** de estas citoquinas se encuentran de manera inversa a los sobrenadantes de PBMCs en presencia de PHA, esto es, bajos en los adultos y los nonagenarios, y aumentados en los septuagenarios. Estos resultados apoyarían las siguientes ideas:

1. Los linfocitos de sujetos de 70-79 años, concretamente los T, pierden, con la edad, la capacidad de responder adecuadamente frente a un reto inmunológico, cuando son cultivados con un mitógeno específico de los mismos. Sin embargo, cuando estas células inmunitarias se encuentran en presencia de todas las demás células sanguíneas, es decir, en un contexto más “real” fisiológicamente, las mismas responden generando más citoquinas pro-inflamatorias, posiblemente debido a la presencia de los componentes celulares de la inmunidad innata, especialmente los neutrófilos. Estos polimorfonucleares están en alta proporción en sangre circulante y no forman parte de la suspensión de mononucleares

(constituida mayoritariamente por linfocitos y en pequeña proporción por monocitos) en donde se analizan las citoquinas secretadas en cultivo en presencia del mitógeno.

2. Los linfocitos T de sujetos de 90-99 años, por el contrario, mantienen una mayor capacidad de responder frente a desafíos inmunitarios, la cual es parecida a la que muestran las células de los adultos, especialmente en el caso de los hombres. Por otra parte, cuando la estimulación tiene lugar en un contexto conjunto y más “real” fisiológicamente, las células inmunitarias de los nonagenarios responden generando más citoquinas pro-inflamatorias que incluso los septuagenarios.

3. No obstante, si bien proporcionalmente los nonagenarios liberan una gran cantidad de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en comparación a edades inferiores, éstos secretan cantidades similares a los adultos de IL-2, IL-6 y la citoquina anti-inflamatoria por excelencia IL-10, tres citoquinas esenciales en la red de interacciones de las citoquinas, lo que indicaría una mejor regulación de la funcionalidad del sistema inmunitario en los nonagenarios.

4. La existencia en los nonagenarios de un sistema inmunitario preservado y unas buenas condiciones de salud también estaría apoyado por el hecho de que los niveles plasmáticos de IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 son parecidos a los de los adultos.

Cabe destacar que los niveles de IL-10 han sido similares en adultos y nonagenarios en todos los tipos de muestra donde ha podido ser valorada esta citoquina. Por el contrario, los leucocitos de los septuagenarios, en un contexto más “real” fisiológicamente, como es la incubación de la sangre completa, en ausencia/presencia de un reto inmunológico, liberan una mayor cantidad de IL-10. Sin embargo, éstos individuos, proporcionalmente (“ratio” de IL-10), secretan hasta 4 veces menos IL-10 ante un desafío inmunitario que los adultos y los nonagenarios. Esta citoquina posee múltiples funciones que ejercen un efecto inhibitorio sobre el proceso inflamatorio: inhibe la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias derivadas de monocitos/macrófagos y linfocitos Th1, atenúa la expresión de membrana del receptor de TNF- $\alpha$  (Pawelec *et al.*, 2000; Streensberg *et al.*, 2003), y protege contra el aumento de la expresión de IL-6, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial inducida por el envejecimiento (Kinzenbaw *et al.*, 2013). Por lo tanto, los nonagenarios, a diferencia de los septuagenarios, serían capaces de compensar los elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias que generan/liberan gracias a la IL-10, ya que podrían controlar mejor las respuestas pro-inflamatorias. De hecho, se ha comprobado que los portadores de genotipos



que producen altos niveles de IL-10, presentan más probabilidad de alcanzar una mayor longevidad (Caruso *et al.*, 2004; Ferrucci *et al.*, 2005).

Además, estos resultados, junto con los obtenidos en el primer objetivo de la presente tesis, sugieren una sobreactivación de los fagocitos, especialmente de los neutrófilos, con la edad, hasta la década de los noventa, siendo esas células en gran medida responsables de la situación de “inflamm-aging”. Sin embargo, la elevada producción de IL-10 que muestran los nonagenarios, y no los septuagenarios, neutralizarían la respuesta inmunitaria adversa presente en la “inflamm-aging”, como parte de un eficiente mecanismo anti-inflamatorio. Este hecho podría ser determinante para favorecer el alcance de una elevada longevidad.

Como **conclusión parcial**, se podría decir que los nonagenarios, al contrario que los septuagenarios, muestran una concentración plasmática y una capacidad de liberación de citoquinas por parte de las células mononucleares (especialmente los linfocitos T) con unos niveles parecidos a los presentados por los adultos. Sin embargo, el género sería un factor a tener muy en cuenta a la hora de analizar individuos longevos, ya que los hombres presentan una funcionalidad más preservada que las mujeres. Por otro lado, en un contexto más parecido a la realidad fisiológica en la que se encuentran las células inmunitarias, ante un reto inmunológico, si bien los nonagenarios liberan la mayor cantidad de citoquinas pro-inflamatorias, al igual que se encuentra descrito en la bibliografía sobre los centenarios, poseen un eficiente mecanismo anti-inflamatorio a través de IL-10.

### 5.3.3. Caracterización de los niveles plasmáticos del marcador de inflamación proteína C reactiva, y de defensas antioxidantes de mujeres y hombres nonagenarios en comparación con adultos y maduros

En relación a la valoración de la **proteína C reactiva (PCR)**, una proteína de fase aguda marcadora de inflamación sistémica, los resultados obtenidos de la comparación entre los grupos de edad adulto y maduro son idénticos a los ya discutidos en el apartado 5.1.3. correspondientes al primer objetivo de la presente tesis, ya que se emplearon los mismos sujetos, tanto hombres como mujeres. En lo referente a los niveles de la PCR observados en los nonagenarios, los mismos fueron muy elevados en comparación a los otros dos grupos de edad, hecho que ocurre en ambos sexos. Este resultado se encuentra ampliamente descrito en la bibliografía, donde el aumento de la PCR tiene lugar, gradualmente, hasta edades muy avanzadas (Ferrucci *et al.*, 2005). De hecho, esta proteína sería responsable, junto con otros mediadores pro-inflamatorios, como las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$ , del elevado estado inflamatorio sistémico característico del envejecimiento y de personas centenarias (Bruunsgaard *et al.*, 1999a; Ferrucci *et al.*, 2005). Cabe destacar que, si bien en los hombres y en las mujeres se aprecia un aumento paralelo de los niveles de la PCR, en ellos ocurre en mayor medida en términos cuantitativos, al igual que ha sido observado por otros autores en edades superiores a los 85 años (Ferrucci *et al.*, 2005).

Por otro lado, en lo que respecta a las **defensas antioxidantes** valoradas en plasma se ha apreciado una disminución de los niveles de **glutación total** a lo largo de los tres grupos de edad estudiados, siendo los nonagenarios, tanto los hombres como las mujeres, los que presentan los menores niveles. Como ya se ha comentado anteriormente, este parámetro hace referencia a la suma de ambas formas de glutación, siendo su forma reducida, GSH, la que más aporta en términos cuantitativos al valor del glutación total, debido a la relación existente entre GSH y GSSG (30-100 a 1) (Hwang *et al.*, 1992). Por lo tanto, estos resultados estarían indicando una disminución en los niveles plasmáticos de GSH en los nonagenarios. Sin embargo, los niveles de GSSG, parámetro no valorado en el presente apartado, podrían, a su vez, estar muy disminuidos, lo que podría dar lugar a un cociente GSH/GSSG aumentado en estos individuos, al igual que han descrito otros autores en el plasma de individuos centenarios en relación a personas jóvenes y mayores (Paolisso *et al.*, 1998).

En cuanto a la **capacidad antioxidante total (TAC)** plasmática, los resultados reflejan un aumento asociado a la edad hasta el grupo de 90-99 años, especialmente en las mujeres. Por el contrario, Kaszubowska y colaboradores (2011) mostraron que el estado reductor del plasma es similar entre personas nonagenarias y jóvenes de unos 26 años de edad media. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente en la discusión perteneciente al primer apartado de la presente tesis (apartado 5.1.3.), la existencia de distintas metodologías para valorar la TAC impide una adecuada comparación entre los resultados de técnicas que se basan en principios diferentes, ya que no todas ellas valoran los mismos compuestos antioxidantes en plasma (Cao y Prior, 1998; Yeum *et al.*, 2004; Bartosz, 2010). Por otro lado, cabe destacar que existe una interacción entre ambos factores analizados, la *edad* y el *género*, lo que da lugar a un comportamiento distinto de dicho parámetro en función del sexo, mostrando unos niveles mayores en los hombres. Aejmelaeus y colaboradores (1997) también observaron un aumento de la TAC del plasma en mujeres hasta los 96 años de edad, mientras que los hombres no mostraron un claro aumento progresivo con la edad. Al igual que indican estos autores, las variaciones en la TAC plasmática podrían ser debidas a la contribución del ácido úrico y de otros antioxidantes sin identificar, los cuales no sólo aumentarían con el envejecimiento, si no que su aportación al valor de TAC también se encontraría incrementado en personas mayores (Ames *et al.*, 1981; Wayner *et al.*, 1985; Aejmelaeus *et al.*, 1997). Dado que la producción de ácido úrico va acompañada por la generación de grandes cantidades de ROS, a través de la xantina oxidasa (Harrison, 2004), el aumento de los niveles de ácido úrico, y por lo tanto de la TAC, podrían ser reflejo de un elevado estrés oxidativo.

Los datos bibliográficos sobre los niveles de compuestos oxidantes, defensas antioxidantes y daño asociado al estrés oxidativo indican que los centenarios se caracterizan por un bajo grado de estrés oxidativo (Paolisso *et al.*, 1998; Mecocci *et al.*, 2000; Barbieri *et al.*, 2003; Alonso-Fernández *et al.*, 2008). El único trabajo encontrado sobre los niveles de defensas antioxidantes en nonagenarios, realizado por Kaszubowska y colaboradores (2011), muestra que el contenido sérico de grupos tiólicos (–SH) es similar entre personas nonagenarias y jóvenes. Sin embargo, en la presente tesis no se ha observado ese mantenimiento en el plasma de los niveles de glutatión total y de la capacidad antioxidante total en nonagenarios con valores semejantes a la de los adultos.

Si bien estos resultados no eran de esperar, no reflejan el estado oxidante/antioxidante de las células inmunitarias, las cuales podrían presentar un equilibrio redox óptimo, y consecuentemente, poseer una adecuada funcionalidad. De hecho, los nonagenarios estudiados en la presente tesis han demostrado una función inmunitaria conservada así como unos niveles de anión superóxido intracelulares bajos, similares a los presentados por los adultos. Esto sugiere la necesidad de llevar a cabo el estudio del contenido intracelular del glutatión, así como de otros compuestos y enzimas antioxidantes en los nonagenarios, ya que unas defensas intracelulares preservadas serían las promotoras de una adecuada funcionalidad de las células inmunitarias (Daynes *et al.*, 2003; De la Fuente y Miquel, 2009). Además, Arranz y colaboradores (2008) observaron que, los niveles plasmáticos de glutatión no eran relevantes en la mejora de la funcionalidad de los leucocitos de sangre periférica, tras un tratamiento en mujeres con N-acetilcisteína (NAC), compuesto tiólico precursor de GSH, y sí los niveles intracelulares de glutatión en neutrófilos y linfocitos periféricos, los cuales serían responsables de la mejor funcionalidad celular.

Como **conclusión parcial** se podría indicar que los nonagenarios presentan unos niveles plasmáticos de inflamación, en cuanto a niveles de la PCR, exacerbados y de defensas antioxidantes mermados. Estos resultados sugieren la necesidad de ahondar en el estudio de los niveles de defensas antioxidantes a un nivel intracelular, con el fin de encontrar una posible explicación a la preservada funcionalidad de las células inmunitarias que presentan los nonagenarios.

#### 5.3.4. Diferencias de género en los parámetros estudiados y discusión general

De entre todos los nonagenarios de la residencia Los Nogales-Pacífico (Madrid) que pudieron ser incluidos en el presente estudio, 26 fueron mujeres y 9 hombres. De hecho, todos los trabajos encontrados sobre el estudio del sistema inmunitario en grupos de personas nonagenarias y centenarias, están constituidos por un mayor número de mujeres que de hombres, del orden de 1 hombre por cada 4, 5, e incluso 7 mujeres. En Europa, la relación entre mujeres y hombres centenarios ronda el 7:1 (Salvioli *et al.*, 2006). Esto provoca que el análisis de las personas longevas de los trabajos citados a lo largo de la discusión de los apartados previos se realice sin tener en cuenta el género. La causa más evidente de esta descompensación es la mayor longevidad de las mujeres frente a los

hombres (Austad, 2006; Eskes y Haanen, 2007). Son muchos los investigadores que han planteado la importancia del género como una variable a tener en cuenta en la longevidad, ya que los hombres y las mujeres estarían sujetos a distintas estrategias para alcanzarla. Así, se ha postulado que la longevidad de las mujeres poseería un menor componente genético con respecto a la de los hombres (Lio *et al.*, 2002; 2003; Caruso *et al.*, 2004; Franceschi *et al.*, 2007). Por desgracia, a pesar de la cantidad de trabajos relacionados con el análisis genético de polimorfismos de citoquinas pro- y anti-inflamatorias asociados al género en la longevidad, los estudios sobre la funcionalidad del sistema inmunitario separando hombres y mujeres de edades avanzadas es casi nulo. Es probable que las diferencias de género en la longevidad estén causadas, al menos en parte, por razones culturales; las mujeres de edades muy avanzadas posiblemente hayan mantenido un estilo de vida más sano y una condiciones ambientales más favorables, debido a las características culturales y antropológicas asociadas al género en las sociedades occidentales de los últimos 100 años (Salvioli *et al.*, 2006).

Sin embargo, hay que destacar que en muchos de los parámetros analizados, los hombres nonagenarios presentan mejores valores que las mujeres nonagenarias, lo que ha llevado a que dichos valores sean más parecidos a los obtenidos en las personas adultas. Esto ocurre en la *quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos*, la *actividad NK*, en los niveles de *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *IL-8* e *IL-10* detectados en el *sobrenadante de células mononucleares tras un estímulo con PHA*, y en los niveles de *IL-6* y *TNF- $\alpha$*  en *plasma*. Curiosamente, pese a que la proporción de mujeres supera a la de los hombres en edades avanzadas, como ya se ha comentado anteriormente, paradójicamente, éstas padecen más enfermedades físicas que los hombres, en términos de días de incapacidad, visitas al médico y hospitalizaciones (Austad, 2006). De hecho, los hombres centenarios serían más sanos y menos heterogéneos que las mujeres centenarias, y por lo tanto, los hombres que alcanzan una elevada longevidad representarían un colectivo más seleccionado en términos de salud (Alonso-Fernández *et al.*, 2008), lo que podría estar sucediendo también en los nonagenarios de la presente tesis.

Por otro lado, el estudio de los niveles de citoquinas presenta muchas complicaciones. Son innumerables las variables que pueden modificar sus niveles además de la edad. Junto con otros factores, el empleo de una u otra metodología, en cuanto al tipo de muestra o el tipo de estímulo empleado, es determinante. En este sentido, consideramos que el análisis

de la liberación de citoquinas en el sobrenadante de sangre completa es la muestra más adecuada, debido a la similitud que muestra con un ambiente fisiológico “real”. De hecho, en la sangre completa existen componentes de los que carecen las muestras de células aisladas, como p. ej. las plaquetas, las cuales interaccionan con los neutrófilos, proveyendo de un mecanismo de regulación durante el inicio de la inflamación (Sreeramkumar *et al.*, 2014). Así, si bien el estudio de los niveles de citoquinas en el sobrenadante de células mononucleares frente a PHA, mitógeno específico de linfocitos T, ha revelado que con el envejecimiento estas células pierden la capacidad de sintetizar/secretar citoquinas, aspecto que no ocurre en las células de los nonagenarios, la literatura describe que el LPS, mitógeno que principalmente estimula a monocitos/macrófagos y neutrófilos, los aumentaría (Sadeghi *et al.*, 1999). Esto indicaría el papel de los monocitos como principales responsables de la liberación de esas citoquinas en los sobrenadantes de mononucleares. Sin embargo, mientras que el estudio de los niveles de citoquinas en el plasma procedente de sangre completa estimulada con LPS ha revelado que con el envejecimiento existe una liberación exacerbada de citoquinas, especialmente las pro-inflamatorias, la bibliografía apunta que la PHA, en este tipo de muestra, no varía los niveles de citoquinas entre sujetos adultos y maduros (Gabriel *et al.*, 2002). Este hecho apuntaría a los monocitos y especialmente a los neutrófilos, como ya se ha argumentado en la discusión del apartado 5.3.2. y del primer objetivo de la presente tesis, como los principales responsables del elevado estado inflamatorio del envejecimiento, incluso en personas nonagenarias. Por lo tanto, las células fagocíticas de la inmunidad innata serían unas de las principales colaboradoras del “inflamm-aging” que se observa con la edad. De hecho, se ha descrito que estas células serían las culpables de la elevada producción de compuestos oxidantes/inflamatorios en el envejecimiento, lo que ha dado lugar a la creación del término “oxi-inflamm-aging”, aspecto que englobaría mejor las razones por las que envejecemos (De la Fuente y Miquel, 2009). Los nonagenarios, sin embargo, presentarían un eficiente mecanismo anti-inflamatorio a través de la IL-10, gracias al cual contrarrestaría el “inflamm-aging”.

Sin embargo, se hacen necesarios más estudios que analicen la liberación de citoquinas en el sobrenadante de sangre completa enfrentada a distintos tipos de estímulos, con varias concentraciones y diversas horas de incubación, con el objetivo de conocer la dinámica de

producción y secreción de las citoquinas con el envejecimiento, y especialmente en las personas que alcanzan una elevada longevidad.

En **conclusión**, los nonagenarios muestran una función del sistema inmunitario similar a la presentada por los adultos. En este sentido, el hecho de que difieran tanto de los maduros/septuagenarios, es una prueba más del papel del sistema inmunitario como buen indicador de la velocidad de envejecimiento y longevidad, lo que lleva a proponer a los nonagenarios como un buen modelo de envejecimiento saludable.

#### 5.4. ESTADO ANTIOXIDANTE ASOCIADO A DIFERENTES CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES Y PATOLOGÍAS EN MUJERES Y HOMBRES MAYORES DE 65 AÑOS

En las últimas décadas, el estrés oxidativo se ha convertido en un foco de interés en la mayoría de las disciplinas biomédicas e investigaciones clínicas. Son innumerables las evidencias que muestran que el estrés oxidativo no sólo se encuentra íntimamente ligado al envejecimiento y a la inflamación, sino también a la obesidad, a la diabetes, a las enfermedades cardiovasculares, a la insuficiencia cardíaca, a la hipertensión, a los trastornos neurodegenerativos y al cáncer (Ames *et al.*, 1993; Markesbery, 1997; Butterfield, 1997; Zhu *et al.*, 2007; Nakbi *et al.*, 2011; Savu *et al.*, 2012; Radovanovic *et al.*, 2012; Wada *et al.*, 2013; Rodrigo *et al.*, 2013; Hendre *et al.*, 2013; Baradaran *et al.*, 2014; Madeddu *et al.*, 2014; Eren *et al.*, 2014; Rani y Mythili, 2014; Tupe *et al.*, 2014; Nour Eldin *et al.*, 2014; Siddiqui *et al.*, 2014; Gruzdeva *et al.*, 2014). En base a esto, el estrés oxidativo podría ser considerado como la "vía final común" a través de la cual los factores de riesgo de múltiples patologías ejercen sus efectos deletéreos.

En la presente tesis se han analizado los niveles de la **capacidad antioxidante total (TAC)** del plasma en una amplia población de hombres y mujeres mayores de 65 años pertenecientes al "Estudio Toledo para un Envejecimiento Saludable" (ETES), y su posible relación con el género del individuo, con diversos índices y/o capacidades funcionales, así como con diversas patologías cardiovasculares y metabólicas.

Los resultados obtenidos a la hora de dividir la población estudiada en función del **género** indican que los hombres poseen unos niveles de TAC significativamente mayores que las mujeres, al igual que los resultados obtenidos en el primer y tercer objetivo de la presente tesis. Los mayores niveles de TAC en los hombres podrían reflejar un mecanismo compensatorio ante situaciones de un mayor estrés oxidativo, como se discutirá más adelante.

Por otro lado, no se han obtenido diferencias significativas en los niveles de TAC entre los distintos individuos clasificados como frágiles, pre-frágiles y no-frágiles, no existiendo así una correlación significativa entre los niveles de TAC y la **fragilidad** establecida según el criterio de Fried (Fried *et al.*, 2001). Las causas de la fragilidad son complejas y multifactoriales, ya que se basan en la interacción entre factores genéticos, biológicos, físicos, psicológicos, sociales y ambientales. Sin embargo, se encuentra ampliamente



aceptado el papel central del estrés oxidativo y la inflamación en el desarrollo de los síntomas de los estados frágiles, siendo el estrés oxidativo uno de los desencadenantes de la aparición del estado inflamatorio crónico (Hubbard y Woodhouse, 2010; Mulero *et al.*, 2011). De hecho, cada vez son más numerosos los estudios que han demostrado una relación entre el síndrome frágil y distintos marcadores de oxidación, como son los niveles aumentados de GSSG o la sobreproducción de anión superóxido por la NADPH oxidasa (Serviddio *et al.*, 2009; Baptista *et al.*, 2012) y de daño oxidativo a distintas biomoléculas, como p. ej. a lípidos (MDA y HNE), a proteínas (carbonilación proteica) y a ADN (8-OHdG) en personas mayores frágiles en relación a las no-frágiles (Serviddio *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Inglés *et al.*, 2014). Sin embargo, al igual que en el presente estudio, no se han encontrado correlaciones significativas entre la fragilidad y otros marcadores de defensas antioxidantes, como p. ej. los niveles de GSH (Serviddio *et al.*, 2009), lo que podría estar indicando que en la fragilidad el estrés oxidativo es debido a una mayor producción de radicales libres, y de oxidantes en general, más que a una disminución de los compuestos antioxidantes, posiblemente porque el organismo está intentando compensar el aumento de oxidantes con una mayor síntesis de moléculas con capacidad reductora.

En cuanto a la **depresión** valorada según la escala geriátrica de depresión (GDS, del inglés *Geriatric Depression Scale*) de Yesavage (1988), no se han observado diferencias en los niveles de TAC por el hecho de padecer o no depresión, ni ninguna correlación significativa entre los distintos niveles de depresión y los de TAC. La implicación del estrés oxidativo en la patofisiología de muchos desórdenes psiquiátricos, entre los cuales se incluye la depresión, se encuentra ampliamente descrita (Milaneschi *et al.*, 2013; Pandya *et al.*, 2013). De hecho, son varios los trabajos que demuestran unos niveles de TAC en plasma disminuidos en personas deprimidas en relación a sujetos control (Cumurcu *et al.*, 2009; Maes *et al.*, 2011; Prohan *et al.*, 2014), además de unos niveles mayores de marcadores oxidantes (Cumurcu *et al.*, 2009; Maes *et al.*, 2011). Sin embargo, también existen estudios donde, si bien encuentran alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo en individuos deprimidos, éstos no muestran diferencias en los niveles de TAC con respecto a sujetos no deprimidos (Sofic *et al.*, 2002; Kotan *et al.*, 2011), al igual que se ha obtenido en los resultados de la presente tesis.

De la misma forma, los niveles de TAC no muestran diferencias significativas en función del **estado cognitivo** según el test de demencias de Folstein o MMSE (Mini-Mental State Examination; Folstein *et al.*, 1975), ni tampoco se ha observado una correlación significativa entre los niveles de TAC y los distintos grados de dicho estado. Son varios los trabajos que sugieren el aumento del estrés oxidativo y/o las deficiencias en algunas defensas antioxidantes, en plasma y eritrocitos, como marcadores del deterioro cognitivo (Berr *et al.*, 2000; Maugeri *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2011). Sin embargo, la ausencia de diferencias en los niveles de TAC en función del estado cognitivo, al igual que han descrito otros autores (Squitti *et al.*, 2009), indicaría la invalidez de este parámetro como marcador de dicho deterioro.

Tampoco se han observado diferencias significativas en relación a la escala de **actividades básicas de la vida diaria**, según el índice de Katz (Katz *et al.*, 1963), ni entre el grado de dependencia a la hora de realizar estas actividades y los valores de TAC. Por el contrario, la escala de **actividades instrumentales de la vida diaria**, según el índice de Lawton (Lawton y Brody, 1969), muestra una correlación negativa, altamente significativa, con los niveles de TAC. Así, los individuos dependientes, a la hora de llevar a cabo estas actividades, presentan unos niveles mayores de TAC que los no dependientes. Son varios los trabajos que establecen una asociación entre parámetros de estrés oxidativo y el deterioro de las habilidades funcionales, como son las actividades básicas e instrumentales de la vida diaria (Maugeri *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2007; Dato *et al.*, 2014). Sin embargo, no se ha encontrado ninguna referencia bibliográfica con respecto a los niveles de TAC. Cabe destacar que cuando el análisis se realiza separando hombres y mujeres, únicamente las mujeres siguen presentado diferencias altamente significativas en los valores de TAC en función de su dependencia para realizar las actividades instrumentales de la vida diaria. Curiosamente, Dato y colaboradores (2014) describen que la asociación entre el estado funcional y ciertos polimorfismos genéticos relacionados con el estrés oxidativo está bajo la influencia del género, dándose las asociaciones más significativas en las mujeres, como ocurre en el gen de la tioredoxina 1, TXNRD1, una enzima que protege del estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos en la relación de los niveles de TAC y el **índice de masa corporal (IMC)**, indican diferencias altamente significativas entre el 50% de los sujetos con el IMC más alto y el 25% de los que lo poseen más bajo, así como una fuerte correlación

positiva entre ambos parámetros (IMC y TAC), especialmente en las mujeres. De hecho, algunos autores describen que el IMC es una variable dependiente del estado antioxidante total del plasma (Cao y Wang, 2013). Es sabido que un IMC alto es sinónimo de sobrepeso u obesidad, y que esta situación se encuentra asociada a un incremento de estrés oxidativo y por lo tanto a daño oxidativo, como la peroxidación lipídica, clave en la generación de las lesiones ateroscleróticas. Así, un IMC alto o la obesidad aumentan el riesgo de padecer una enfermedad coronaria y eleva las probabilidades de adquirir otros factores de riesgo cardiovascular, como son la hipertensión, los niveles elevados de colesterol en sangre y la diabetes mellitus de tipo II (Siddiqui *et al.*, 2014). Es más, Nour Eldin y colaboradores (2014) muestran una correlación positiva entre el IMC y la lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada, la cual es la base de la formación de la placa de ateroma, y conduce a una mayor probabilidad de padecer enfermedades isquémicas. Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que todas estas alteraciones y/o patologías aparecen asociadas a niveles elevados de TAC, como se discutirá más adelante.

En cuanto a las patologías relacionadas con la enfermedad cardiovascular, son numerosos los trabajos que destacan una relación entre la presencia de compuestos oxidantes y antioxidantes y la **claudicación intermitente** (Unno, 2014), la **trombosis venosa profunda** (Ekim *et al.*, 2014), la **embolia pulmonar** (Halici *et al.*, 2014), la **fibrilación auricular** (Youn *et al.*, 2013), el **accidente cerebrovascular** (Parizadeh *et al.*, 2011; Cojocar *et al.*, 2013), y el **ataque isquémico transitorio** (Parizadeh *et al.*, 2011). En la presente tesis no se ha apreciado ninguna variación en los niveles de TAC en función de padecer o no cualquiera de estas anomalías. Esto podría estar indicando que el aumento de la producción de radicales libres, descrito en la bibliografía sobre estas patologías, no estaría amortiguado por un sistema de defensa antioxidante eficiente, al menos en el plasma. Sólo en el caso del accidente cerebrovascular, son varias las publicaciones que hacen referencia a unos valores menores de TAC en los pacientes en relación a los sujetos sanos (Cojocar *et al.*, 2013; Abdullah *et al.*, 2013; Gonullu *et al.*, 2014). En este sentido, la ausencia de diferencias en los niveles de TAC obtenida en la presente tesis podría deberse o bien a la metodología empleada, de la que ya se discutió anteriormente sus limitaciones, o bien al tiempo transcurrido desde la aparición de la patología y el momento de la obtención de la muestra a

analizar, ya que los estudios recién citados realizan sus valoraciones al poco tiempo de que los pacientes hayan sufrido el accidente cerebrovascular.

Cuando se compararon los niveles de TAC en función de poseer o no el **colesterol (LDL) alto**, no se encontraron diferencias significativas. Los valores elevados de LDL es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular, ya que esta lipoproteína de baja densidad tiende a acumularse en las paredes de las arterias, como las coronarias, aumentando el riesgo de padecer una angina de pecho o un infarto de miocardio, situaciones relacionadas con la presencia de un estrés oxidativo, como se discutirá más adelante. La ausencia de diferencias en los niveles de TAC puede ser debido a que la obtención de la variable “colesterol alto” fue el resultado de la pregunta *¿Algún profesional sanitario le dijo que tenía el colesterol alto?* (ver CCV12 en el apartado sobre comorbilidad cardiovascular del anexo 1), y no el resultado de la medición de los niveles de colesterol en sangre en sí misma, lo que habría aportado una mayor precisión a la hora de analizar los datos.

Por otra parte, los niveles de TAC muestran una tendencia a estar aumentados en las personas que han padecido una **angina de pecho**, que han sido **intervenidos en el corazón o en alguna arteria**, que padecen de alguna **valvulopatía** o que presentan **diabetes**. Cuando el análisis estadístico se realiza separando hombres y mujeres, son sólo las mujeres las que muestran una variación significativa de los valores de TAC en función de presentar o no alguna de estas condiciones.

Además, en los casos en que se ha sufrido un **infarto de miocardio**, o se ha padecido de **insuficiencia cardíaca** o **hipertensión arterial**, los valores de TAC son mayores que en los respectivos controles, especialmente en el caso de padecer hipertensión, donde las diferencias son altamente significativas. Cuando se integra el factor *género*, estas diferencias sólo las muestran las mujeres en el caso del infarto y la insuficiencia cardíaca, mientras que tanto las mujeres como los hombres hipertensos poseen, separadamente, valores mayores de TAC que los correspondientes sujetos normotensos.

El mayor hallazgo en la investigación sobre enfermedades cardiovasculares es que las reacciones oxidantes juegan un papel central en su patogénesis (Ames *et al.*, 1993). Así, se encuentra ampliamente demostrado que el estrés oxidativo inducido por el aumento en la producción de ROS y RNS, y el daño derivado de estas moléculas perjudiciales, contribuyen de manera determinante a la aparición de varias enfermedades cardiovasculares, como la

cardiopatía isquémica, donde se incluiría la angina de pecho (Nakbi *et al.*, 2011) y el infarto de miocardio (Nakbi *et al.*, 2011; Siddiqui *et al.*, 2014; Gruzdeva *et al.*, 2014), la valvulopatía (Wada *et al.*, 2013; Eren *et al.*, 2014), la insuficiencia cardíaca, en general (Radovanovic *et al.*, 2012; Rawat *et al.*, 2014; Karabacak *et al.*, 2014), y la hipertensión (Rodrigo *et al.*, 2013; Hendre *et al.*, 2013; Baradaran *et al.*, 2014). Son varias las fuentes de radicales libres localizadas en las células endoteliales del sistema cardiovascular, como la xantina oxidasa, la NAD(P)H oxidasa, la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y los citocromos de las mitocondrias (Valko *et al.*, 2007). El aumento de la producción de radicales libres en la pared vascular, debido a la agresión de factores como el tabaco, la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, o las cantidades elevadas de LDL, entre otros, conduce a la modificación de los fosfolípidos y lipoproteínas, alterando la estructura y la funcionalidad de las células, a través de mecanismos inflamatorios y oxidativos. Este proceso contribuye a la aterogénesis, y al desarrollo, progresión y desestabilización de las lesiones ateroscleróticas, forma más común de la arterioesclerosis (Kukreja y Hess 1992; Wada *et al.*, 2013; Uppal *et al.*, 2014). Interesantemente, algunos trabajos muestran una correlación positiva entre la gravedad de la patología y la presencia de ciertos parámetros de oxidación, lo que abre la posibilidad de emplearlos como marcadores con el fin de evaluar el estado de la enfermedad (Nakbi *et al.*, 2011; Yilmaz *et al.*, 2013), o incluso predecir la muerte (Radovanovic *et al.*, 2012).

No menos importante es que estas patologías que se han mencionado van acompañadas por la disminución de los sistemas de defensa antioxidante debido, posiblemente, a su utilización con la finalidad de neutralizar las elevadas cantidades de oxidantes que se producen. Este hecho, que se encuentra descrito en la insuficiencia cardíaca en general (Radovanovic *et al.*, 2012), y concretamente en la angina de pecho (Buko *et al.*, 2014), el infarto de miocardio (Siddiqui *et al.*, 2014; Abe *et al.*, 2014), la valvulopatía (Miller *et al.*, 2008), y en la hipertensión (Baradaran *et al.*, 2014) parece contribuir también de forma importante al estado de estrés oxidativo y al consecuente daño vascular. Sin embargo, la bibliografía recién citada no analiza la cantidad de TAC. Los trabajos encontrados en los que fue valorado este parámetro muestran una ausencia de variaciones en sus niveles en los sujetos con valvulopatía (Eren *et al.*, 2014) y con insuficiencia cardíaca (Karabacak *et al.*, 2014) en relación a los observados en individuos sanos. Sin embargo, todos los estudios llevados a cabo en personas con hipertensión arterial describen una disminución

de los valores de TAC en comparación con los sujetos normotensos (Hendre *et al.*, 2013; Rodrigo *et al.*, 2013; Cao y Wang, 2013), observando una correlación negativa entre tales valores y la tensión arterial (Rodrigo *et al.*, 2013). De hecho, como ya se ha comentado, de entre todas las enfermedades cardiovasculares analizadas en la presente tesis, la hipertensión arterial ha sido la variable que más significación estadística ha mostrado en relación a los niveles de TAC. Cada vez son más las evidencias del papel central del estrés oxidativo en la patogénesis de la hipertensión, patología que, además, es el factor de riesgo cardiovascular principal y más común para toda una serie de insuficiencias cardíacas, como el infarto de miocardio y el aneurisma aórtico, así como de los accidentes cerebrovasculares (González *et al.*, 2014; Baradaran *et al.*, 2014). Además, la hipertensión se asocia muchas veces a desórdenes metabólicos como la diabetes (Baradaran *et al.*, 2014).

Por otro lado, las intervenciones quirúrgicas realizadas en el corazón o en alguna arteria implican una inducción de estrés oxidativo, mayor del ya presentado por el sujeto debido a la patología que sufre, y el cual se revierte o no en función del tipo de cirugía llevada a cabo para subsanarla (Rahsepar *et al.*, 2013; Plicner *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos en la presente tesis indican la existencia de un efecto compensatorio de las defensas antioxidantes en las personas que han sufrido tales operaciones, especialmente en las mujeres. Sin embargo, cabe destacar la gran heterogeneidad de esta variable debido al gran número de tipos diferentes de intervención quirúrgicas existentes en el grupo estudiado. Sin embargo, no se ha encontrado ningún trabajo en donde se analicen los niveles de TAC en personas con esas características.

Otro factor de riesgo cardiovascular es la diabetes mellitus de tipo II, de gran prevalencia en la población mayor y que se caracteriza por una hiperglicemia extracelular crónica resultando en daño tisular y complicaciones patofisiológicas como enfermedades cardíacas y aterosclerosis, entre otras (Valko *et al.*, 2007). Una de las principales causas patofisiológicas desencadenada por la hiperglicemia de la diabetes y sus complicaciones crónicas es el estrés oxidativo (Savu *et al.*, 2012). La perturbación en el balance oxidativo, debido al aumento de la producción de radicales libres y a la depleción de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, lleva a una acumulación de ROS/RNS, que causa el daño celular (Savu *et al.*, 2012; Rani y Mythili, 2014; Tupe *et al.*, 2014), el distintivo de los mecanismos moleculares responsables de la enfermedad cardiovascular (Selvaraju *et al.*,

2012). Los resultados de la presente tesis muestran unos valores mayores de TAC en los individuos diabéticos, al igual que han descrito otros autores (Savu *et al.*, 2012), especialmente en las mujeres. Sin embargo, también existen trabajos donde se aprecian cantidades menores de TAC en estos pacientes en comparación con los presentes en los sujetos sanos (Tupe *et al.*, 2014).

El hecho de que en las condiciones patológicas y en aquellas que reflejan un mayor deterioro funcional, los valores de TAC sean mayores, cuando bibliográficamente se encuentra ampliamente demostrado que están sujetas a estrés oxidativo, podrían estar indicando un estado de intento de compensación por parte del organismo a un mayor reto de defenderse de la elevada producción de compuestos oxidantes. Sin embargo, cabe destacar que, debido al método empleado, donde se analiza únicamente la fracción de los antioxidantes solubles, existe la posibilidad de que los valores de TAC estén reflejando los correspondientes al ácido úrico, principal antioxidante soluble del plasma humano (Ames *et al.*, 1981; Aejmelaesus *et al.*, 1997). Cao y Wang (2013) describen que el ácido úrico es una variable dependiente del estado antioxidante total, y *viceversa*, lo que indicaría que ambos parámetros son mutuamente influenciados, partiendo del hecho de que una gran parte de la TAC es ácido úrico, al igual que se ha observado en el primer objetivo de la presente tesis. Siendo esto así, no son de extrañar los elevados valores de TAC obtenidos en la presente tesis en las condiciones patológicas estudiadas, teniendo en cuenta que son varios los trabajos que hacen referencia a unos niveles elevados de ácido úrico en diversas enfermedades, como la hipertensión (Tosu *et al.*, 2014), la diabetes mellitus (Savu *et al.*, 2012), la valvulopatía (Demir *et al.*, 2012) o la insuficiencia cardíaca en general (Yazicioğlu *et al.*, 2012; Radovanovic *et al.*, 2014; Karabacak *et al.*, 2014). Precisamente en estos últimos casos los autores proponen al ácido úrico como marcador de prognosis (Yazicioğlu *et al.*, 2012; Demir *et al.*, 2012; Radovanovic *et al.*, 2014).

La síntesis de ácido úrico, a través de la enzima xantina oxidasa, conlleva una producción de cantidades grandes de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot -}$ , enzima cuya actividad se ha visto elevada en una infinidad de procesos patológicos, como las enfermedades cardiovasculares (Granger *et al.*, 2001; Tamariz *et al.*, 2014; González *et al.*, 2014), y se ha propuesto como la fuente principal de ROS en la diabetes (Butler *et al.*, 2000). Por lo tanto, los mayores niveles de ácido úrico y por consecuencia de TAC, estarían indicando una situación de mayor estrés oxidativo. De

hecho, a pesar del carácter antioxidante del ácido úrico, son varios los autores que la han propuesto como indicador de estrés oxidativo (Tamariz *et al.*, 2014; Tosu *et al.*, 2014).

Además, cabe destacar la importancia del factor **género** sobre los niveles de TAC, ya que en todas las variables analizadas en el presente estudio, los hombres poseen unos valores mayores que las mujeres, especialmente en ausencia de alteración o patología, pues en presencia de las mismas los valores de TAC de ambos sexos se igualan, excepto en la hipertensión. Los hombres hipertensos continúan mostrando niveles superiores a las mujeres. De hecho, algunos autores describen que el estado antioxidante total es una variable dependiente del género (Cao y Wang, 2013). Como ya se ha comentado en la discusión del primer objetivo de la presente tesis, las mujeres muestran un aumento sustancial del ácido úrico con el envejecimiento, como consecuencia de la pérdida de los estrógenos. Este aumento de ácido úrico, que tendría fines beneficiosos como la neutralización de peroxinitritos, moléculas cuya formación puede estar acelerada en tejidos isquémicos (Aejmelaeus *et al.*, 1997), se traduciría en un incremento de TAC, el cual sería, consecuentemente, más patente que en los hombres. Por lo tanto, el marcado aumento de ácido úrico en las mujeres, ante una situación patológica, podría ser la causa del por qué en ellas se observan tantas diferencias estadísticamente significativas en función de su estado funcional/patológico.

Como **conclusión** se podría decir que la capacidad antioxidante total es un buen indicador de estrés oxidativo en situaciones fisiológicamente adversas, más que un marcador del estado antioxidante del organismo. Sin embargo, esta utilización sería aplicable únicamente en las mujeres.



### 5.5. ENVEJECIMIENTO PREMATURO ASOCIADO A UNA PATOLOGÍA. CAMBIOS EN LA FUNCIONALIDAD DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EN LOS NIVELES DE DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN HOMBRES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC) MODERADA Y SEVERA

En la última década, son numerosas las líneas de investigación que han propuesto que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una afección sistémica, más que una simple enfermedad pulmonar (Wouters *et al.*, 2002; Rahman, 2002; Dourado *et al.*, 2006). Si bien se encuentra ampliamente demostrado que con esta enfermedad tiene lugar un aumento de marcadores relacionados con la inflamación y la oxidación, lo que parece encontrarse correlacionado con la gravedad de la enfermedad (Oudijk *et al.*, 2005; Nadeem *et al.*, 2005; Ben Anes *et al.*, 2014), no son muchos los trabajos que valoran la función y estado oxidativo de las células inmunitarias, así como la liberación de citoquinas, tanto pro como anti-inflamatorias, en muestras leucocitarias periféricas. Una serie de estudios demuestran la existencia de una desregulación en ciertas funciones de leucocitos sanguíneos de personas con EPOC (Burnett *et al.*, 1987; Noguera *et al.*, 1998; 2001; Prieto *et al.*, 2001; Drost y MacNee, 2002; Nadeem *et al.*, 2005; Wehlin *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2006; Urbanowicz *et al.*, 2009; Blidberg *et al.*, 2013), pero el análisis de la funcionalidad de las células inmunitarias comparando grupos de pacientes con distintos grados de la enfermedad ha sido hasta el momento muy escaso.

Por otro lado, son varios los investigadores que han sugerido que con la EPOC tiene lugar un envejecimiento acelerado, caracterizado por un elevado estado pro-inflamatorio, la inversión del cociente CD4/CD8 en los leucocitos sanguíneos y un declive en el estado de salud, lo que resulta en una elevada comorbilidad y una menor esperanza de vida media en los pacientes con EPOC (Barnes *et al.*, 2003; Wouters, 2005; Dourado *et al.*, 2006; Hodge *et al.*, 2007; Rabe *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009).

Por ello, en la presente tesis se han estudiado toda una serie parámetros de función inmunitaria, los cuales se han establecido como marcadores de velocidad de envejecimiento y longevidad, así como una serie de defensas antioxidantes, con el fin de comprobar cómo se encuentran afectados en pacientes con EPOC, y con diferentes grados de la enfermedad. Para ello, se analizó un grupo de hombres de 50-70 años con EPOC, subdivididos en dos

grupos en función de la gravedad de la enfermedad, grado moderado y severo, que se compararon con hombres sanos de la misma edad cronológica.

En relación a la capacidad de **adherencia** de los **neutrófilos** y los **linfocitos**, los resultados obtenidos indican la existencia de un aumento en los niveles de dicha función en personas con EPOC de grado severo, especialmente en los neutrófilos, donde se observan diferencias significativas no sólo con respecto a los controles sino también con el grupo de pacientes con el grado moderado de la enfermedad. Son numerosos los trabajos que demuestran una alteración en la expresión de moléculas de adhesión, no sólo en los leucocitos periféricos, también en las células endoteliales de personas con EPOC (Noguera *et al.*, 1998; 2001; Yurdakul *et al.*, 2004; Wehlin *et al.*, 2005; Blidberg *et al.*, 2012; 2013), y en algunos de esos estudios se observó un aumento de dichas moléculas. Este incremento de las moléculas de adhesión, como Mac-1 y CD11b, que ha sido descrito especialmente para los neutrófilos (Noguera *et al.*, 1998; 2001; Yurdakul *et al.*, 2004; Blidberg *et al.*, 2012; 2013), podría explicar la mayor capacidad de adherirse que muestran estas células, lo que contribuiría a su reclutamiento en el pulmón (Noguera *et al.*, 2001). Los pacientes con EPOC de grado moderado no presentaron variaciones en la capacidad de adherencia en ninguno de los dos tipos de células en comparación con los individuos sanos. Puesto que los trabajos antes citados analizan indistintamente enfermos que, según la clasificación establecida por la GOLD, se englobarían dentro de los grados moderado y severo, y no se ha encontrado ningún estudio donde establezcan una comparación entre los distintos grados de la enfermedad, no es posible profundizar en la discusión del alcance de las alteraciones funcionales de los leucocitos en función del estadio del paciente. Dada la estrecha relación entre la capacidad de expresión de las moléculas de adhesión y el estado de oxidación, la cual se establece a través de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 implicados en dicha expresión y activados por el estrés oxidativo, como ya se ha comentado ocurre en el envejecimiento (Hirokawa, 1999; Miles *et al.*, 2001), el aumento de adhesión en pacientes con EPOC podría estar reflejando los efectos acumulativos del estrés oxidativo crónico en el caso de los individuos con grado severo de la enfermedad. De hecho, las personas con EPOC muestran un elevado estrés oxidativo a un nivel sistémico, como se discutirá más adelante, así como unos mayores niveles de la actividad constitutiva de AP-1 y de la actividad de NF- $\kappa$ B en respuesta a LPS en macrófagos alveolares (MacNee, 2000; He *et al.*, 2001; MacNee y

Rahman, 2001; Rahman, 2002; Nadeem *et al.*, 2005; Ben Moussa *et al.*, 2014; Ben Anes *et al.*, 2014).

En cuanto a la **quimiotaxis**, los resultados obtenidos en la presente tesis mostraron un aumento de esta capacidad de movilidad inducida de los leucocitos en respuesta al quimioatrayente fMLP, que en el caso de los **neutrófilos** aparece tanto en estadio severo como en el moderado, mientras que en los **linfocitos** tiene lugar de forma significativa sólo en el grado severo de la enfermedad. Si bien no se ha encontrado ningún estudio que analice la quimiotaxis de los linfocitos, los que hay utilizando neutrófilos de personas con EPOC también indican una respuesta quimioatrayente aumentada de estas células (Burnett *et al.*, 1987), hecho que podría ser debido a que los neutrófilos de personas con EPOC poseen mayores niveles del receptor de fMLP que los sujetos sanos (Matheson *et al.*, 2003). Esta mayor quimiotaxis contribuiría al reclutamiento de los neutrófilos en el tejido pulmonar y al aumento de la carga proteolítica de los pulmones, uno de los mecanismos patológicos asociado al daño tisular descrito en esta enfermedad (Burnett *et al.*, 1987). Así, los resultados de la presente tesis podrían estar señalando bien una participación temprana por parte de los fagocitos periféricos a dicha proteólisis pulmonar, puesto que aparecen alteraciones de la quimiotaxis ya en el grado moderado de la enfermedad, o bien que los neutrófilos podrían ser un buen marcador del desarrollo de la enfermedad por ser sensibles a la liberación de mediadores liberados al inicio de la patología que modifican esta capacidad funcional. De hecho, los elevados niveles de IL-8, principal citoquina quimioatrayente de los neutrófilos, observados en el lavado broncoalveolar, el esputo y el sobrenadante de cultivo de macrófagos alveolares de personas con EPOC (Keatings *et al.*, 1996; He *et al.*, 2003; Schmidt-loanas *et al.*, 2006; Takizawa, 2007), podrían ser responsables de la elevada respuesta quimiotáctica presentada por los neutrófilos, ya desde estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo, no se ha encontrado ningún estudio que analice los niveles de IL-8 en leucocitos periféricos de personas con EPOC, análisis que fue llevado a cabo en la presente tesis en el plasma procedente de sangre estimulada previamente con LPS y que se discutirá más adelante.

Por otro lado, el índice de **fagocitosis** de los pacientes con EPOC ha sido menor que en los sujetos control, apreciándose que esta función va disminuyendo al aumentar la gravedad de la enfermedad. En apoyo a estos resultados, los de Prieto y colaboradores (2001) también

describieron una menor actividad fagocítica de monocitos y neutrófilos de sangre periférica en sujetos con EPOC, especialmente de los segundos, lo que podría indicar una inmunidad innata defectuosa. El rango de FEV<sub>1</sub> del grupo de los pacientes con EPOC empleado en el estudio citado fue de 50±13 % del valor de referencia para hombres de 62 años de edad media, por lo que estos investigadores habrían incluido en un mismo grupo de análisis a pacientes con los estadios moderado y severo de la enfermedad, y si bien corrobora el resultado obtenido en la presente tesis, se pierde la posibilidad de observar el grado de la alteración de la actividad fagocítica en función de la severidad de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad de **anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)** intracelular de los neutrófilos *en condiciones basales*, se observó un aumento que resultó mayor al avanzar la gravedad de la enfermedad, mientras que *en condiciones estimuladas*, dicho aumento sólo fue observado en el grado severo. Son muchos los autores que describen un incremento en la liberación de los ROS por parte de los leucocitos presentes tanto en las vías respiratorias como en la sangre de los sujetos con EPOC. Además, estos mayores niveles serían observados en condiciones basales y estimuladas (MacNee, 2000; Noguera *et al.*, 2001; Nadeem *et al.*, 2005), lo que sugerirían la existencia de un elevado estado de oxidación en los enfermos. Sin embargo, al analizar la relación entre ambas condiciones, tanto los pacientes con EPOC moderado como severo presentan un menor *porcentaje de estimulación de O<sub>2</sub><sup>-</sup>*, lo que indicaría un mecanismo microbicida defectuoso en los sujetos enfermos, que imposibilitaría una adecuada destrucción/neutralización de posibles partículas o microorganismos invasores que hubieran sido fagocitados. Otros autores también han descrito una disminución relativa de los niveles de ROS en neutrófilos, en respuesta a otros estímulos como fMLP y TNF-α+fMLP en individuos con EPOC (Wehlin *et al.*, 2005).

En cuanto a la **actividad citotóxica** de las células NK, los resultados obtenidos en la presente tesis indican una disminución altamente significativa de sus niveles, tanto en personas con EPOC de grado moderado como de severo, con respecto a los controles, al igual que describen otros autores sobre la actividad de estas células con la enfermedad (Prieto *et al.*, 2001; Urbanowicz *et al.*, 2009). Los bajos niveles de este parámetro, propuesto como marcador de salud y predictor de morbilidad, estarían reflejando el deteriorado estado de salud que presentan los pacientes con EPOC (Myśliwski *et al.*, 1993; Ginaldi *et al.*, 1999).

Esta menor capacidad de defensa frente a células infectadas y cancerosas ya se manifestaría en el grado moderado de la enfermedad, lo que permitiría sugerir a la actividad NK como un marcador de inicio de la patología.

Los resultados obtenidos en relación a la **respuesta linfoproliferativa en ausencia de estímulo**, los pacientes con EPOC de grado moderado muestran un aumento significativo de sus niveles en relación a los sujetos sanos, mientras que los EPOC de grado severo no presentan diferencias significativas con ninguno de los dos grupos. Por otro lado, *en presencia de PHA*, la respuesta proliferativa de los pacientes aparece disminuida, siendo esa disminución estadísticamente significativa en los de grado severo. Sin embargo, al relacionar la respuesta proliferativa estimulada y la basal, ambos grados de la enfermedad presentan una *capacidad de estimulación proliferativa* significativamente inferior a los individuos sanos. Esta disfunción de los linfocitos ante un reto mitogénico también ha sido observado por otros investigadores (Reyes *et al.*, 2006). Los enfermos con EPOC presentarían un desequilibrio en la homeostasis celular de los linfocitos T, los cuales muestran una regulación al alza de diversas vías apoptóticas que conducen a una elevada muerte de estas células (Hodge *et al.*, 2003). Además, otros autores describen que los enfermos muestran un declive de linfocitos T *naïve* junto con una expansión oligoclonal de los T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>nulo</sup>, consecuencia de la estimulación antigénica crónica. El aumento de este tipo celular inhibe las respuestas antígeno específicas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, resultando en una respuesta adaptativa deteriorada (Sharma *et al.*, 2009).

En relación a los niveles de **citoquinas** en los pacientes con EPOC, cabe destacar la extensa bibliografía existente sobre ciertas citoquinas en muestras procedentes del pulmón, como el TNF- $\alpha$  (Keatings *et al.*, 1996; He *et al.*, 2001; Foschino Barbaro *et al.*, 2007), la IL-6 (Chung, 2001; Foschino Barbaro *et al.*, 2007) y la IL-8 (Keatings *et al.*, 1996; Chung, 2001; He *et al.*, 2001; 2003; Takizawa, 2007). Estas tres citoquinas aparecen elevadas en el compartimento pulmonar y se encontrarían implicadas en el proceso inflamatorio de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de que varios trabajos analizan sus niveles en plasma, son muy pocos aquellos que emplean leucocitos periféricos a la hora de valorar estas citoquinas. En este sentido, los resultados obtenidos en la presente tesis en relación a la liberación de **TNF- $\alpha$**  por parte de los leucocitos de sangre periférica, tras ser estimulados con LPS, indican un aumento progresivo de la misma a mayor gravedad de la enfermedad, si bien es sólo en

los pacientes de grado severo en los que el incremento alcanza significación estadística. El papel del TNF- $\alpha$  está considerado clave en la inflamación pulmonar y sistémica de la EPOC, y se encuentra estrechamente implicado en la elevada comorbilidad que padecen estos enfermos, como la disfunción del músculo esquelético, la osteoporosis y la diabetes tipo II (Sinden y Stockley, 2010). Son muchos los autores que han observado unos valores elevados de TNF- $\alpha$  en el plasma de los sujetos con EPOC (Gan *et al.*, 2004; Foschino Barbaro *et al.*, 2007). De hecho, estos pacientes parecen mostrar un perfil de citoquinas pro-inflamatorias Th1 en sangre, además de en el lavado broncoalveolar y en los linfocitos T CD8+ intraepiteliales (Hodge *et al.*, 2007). En 2003, Hodge y colaboradores encontraron un aumento en el TNF- $\alpha$  intracelular, tras una estimulación con PMA e ionomicina, en monocitos y linfocitos T periféricos de personas con EPOC. Sin embargo, Barceló y colaboradores (2006) no observaron ninguna variación en la cantidad de esta citoquina en linfocitos T CD4+ y CD8+ periféricos de pacientes tras una estimulación similar. Ambos trabajos, aparentemente contradictorios entre sí, podrían apoyar los resultados obtenidos en la presente tesis, ya que el grupo de pacientes del primer trabajo citado (en el que se detectó un aumento del contenido de TNF- $\alpha$  en algunos leucocitos) tenían un valor medio de FEV<sub>1</sub> del 47,5%, cifra situada en el grado severo de la enfermedad; mientras que los del segundo estudio (con ausencia de diferencias en los niveles de TNF- $\alpha$  intralinfocitarios) eran del 57%, valor situado en el grado moderado de la enfermedad. Así, el grado de severidad de la enfermedad sería determinante sobre la capacidad de producción/liberación de TNF- $\alpha$  de los leucocitos periféricos de personas con EPOC ante un reto inmunitario. De hecho, se ha descrito una correlación negativa entre los valores de FEV<sub>1</sub> y el porcentaje de linfocitos T CD8+ del lavado broncoalveolar e intraepiteliales que producen TNF- $\alpha$ , es decir, a mayor obstrucción de las vías respiratorias, mayores niveles de linfocitos T CD8+ que producen TNF- $\alpha$  (Hodge *et al.*, 2007). Todo esto podría sugerir que los leucocitos periféricos, al igual que aquellos procedentes del pulmón, muestran una sobreactivación de la liberación de TNF- $\alpha$  que dependería en función de la severidad de la enfermedad. También en el caso de la IL-6 presente en el plasma procedente de sangre estimulada con LPS, únicamente los pacientes con el grado severo muestran unos mayores valores de esta citoquina en relación a los sujetos control. Cabe destacar que no se ha encontrado ningún trabajo en el que se haya valorado esta citoquina en leucocitos de sangre periférica. No obstante, en el plasma algunos autores han observado unos niveles aumentados (Foschino Barbaro *et al.*, 2007),

pero otros inalterados (Schmidt-loanas *et al.*, 2006) con la enfermedad. En el sobrenadante de cultivo de macrófagos alveolares frente a LPS, también ha sido detectado un ligero aumento de los niveles de IL-6 en pacientes con EPOC (He *et al.*, 2003).

Los resultados referentes a la **IL-8** en el plasma de sangre incubada con LPS, muestran un aumento significativo de su liberación, respecto a los controles sanos, en ambos grados de la enfermedad, pero siendo en el severo donde el aumento es más significativo. Esta citoquina ha sido ampliamente estudiada en muestras pulmonares debido a su propiedad quimioatrayente de los neutrófilos, células que se encuentran en grandes cantidades en los pulmones de los enfermos con EPOC, y que liberan enzimas proteolíticas y ROS causantes del daño tisular (MacNee, 2000; Maestrelli *et al.*, 2001; Tetley, 2005). Así, la IL-8 jugaría un papel esencial en la patogénesis de las lesiones pulmonares (Takizawa, 2007). De hecho, en el sobrenadante de cultivo de macrófagos alveolares en presencia de LPS, los pacientes con EPOC muestran una concentración de IL-8 mucho mayor que los individuos sanos (He *et al.*, 2003). En esas células el aumento de la actividad de AP-1 y NF- $\kappa$ B regularía positivamente la producción de esta citoquina (He *et al.*, 2001). Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, no se ha encontrado ningún trabajo donde hayan valorado esta citoquina en leucocitos periféricos. Los resultados de la presente tesis indicarían que incluso a nivel periférico, las células inmunitarias parecen poseer una mayor capacidad de producir/liberar IL-8 en relación a sujetos sanos de la misma edad, liberación que aumenta a mayor gravedad de la enfermedad, lo que contribuiría al proceso inflamatorio crónico de la misma y a su empeoramiento. Es más, la elevada respuesta quimiotáctica por parte de los neutrófilos, que ha sido observada en los resultados de la presente tesis, podría ser debida a los elevados niveles de IL-8 que producen los leucocitos periféricos, y en concreto los propios neutrófilos (Bazzoni *et al.*, 1991). Como ya se ha comentado en la discusión del primer y tercer objetivo de la presente tesis, estas células, junto con los monocitos, poseerían un papel principal en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-6 y TNF- $\alpha$  (Sadeghi *et al.*, 1999; Dalboni *et al.*, 2013), cuyos valores se encuentran elevados también en esta enfermedad.

Por otro lado, la **IL-10** en el plasma de sangre estimulada con LPS aparece disminuida en los pacientes con EPOC en comparación con los controles, siendo mayor tal disminución al aumentar la gravedad de la enfermedad. Son pocos los trabajos encontrados que valoren esta citoquina a un nivel periférico. Zhu y colaboradores (2009) demostraron que el

porcentaje de linfocitos T CD4+ circulantes que producen IL-10 es menor en pacientes con EPOC, y que además, la proporción de estas células disminuía a mayor severidad de la enfermedad. Así, la capacidad de producir/liberar esta citoquina anti-inflamatoria aparecería afectada con la enfermedad, lo que impediría el adecuado control de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias que se produce en estos pacientes con EPOC, incapacidad que, además, sería dependiente a la gravedad de la enfermedad. De este modo en el grado severo, cuando la liberación de citoquinas pro-inflamatorias es mayor, la defensa antiinflamatoria que podría ejercer la IL-10 es menos posible.

En lo referente a las **defensas antioxidantes**, los resultados obtenidos en la presente tesis, muestran que el contenido intracelular de **glutación total** en **neutrófilos** aparece muy disminuido tanto en los sujetos con EPOC de grado moderado como severo. En los **linfocitos**, la disminución de este antioxidante es mayor al aumentar la gravedad de la enfermedad, alcanzando significación estadística en el grado severo. A pesar de que se encuentra extensamente descrito el elevado estrés oxidativo de los pacientes con EPOC, debido al aumento de oxidantes y déficit de defensas antioxidantes, los estudios llevados a cabo en los valores de glutación a nivel sistémico sólo han considerado el plasma como muestra a analizar. Los niveles plasmáticos de glutación, así como de otros marcadores antioxidantes, disminuyen con la enfermedad (Zeng *et al.*, 2013; Ben Moussa *et al.*, 2014; Ben Anes *et al.*, 2014), hecho que mostraría un paralelismo con los niveles encontrados en el pulmón (Zeng *et al.*, 2013). Es más, el glutación poseería un papel central en la patogénesis de la EPOC, ya que es el principal neutralizador de las ROS. Por lo tanto, la alteración de su metabolismo conduciría a un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, a favor a los primeros, característica ampliamente descrita en enfermedades pulmonares inflamatorias como lo es la EPOC (Rahman y MacNee, 1999). Además, los bajos niveles intracelulares de glutación en las células inmunitarias podrían ser los responsables, al menos en parte, del deterioro funcional que sufren las mismas, como ha sido comprobado en varios estudios (Dröge *et al.*, 1994; Meydani *et al.*, 1995; Arranz *et al.*, 2008). Cabe destacar que los linfocitos de los sujetos sanos poseen los mayores niveles de glutación, y que la disminución de sus valores por la presencia de la EPOC es mucho menor que en el de los neutrófilos. Este hecho también fue observado en el contenido de ácido ascórbico de linfocitos *versus* macrófagos peritoneales de ratones tras un estrés oxidativo agudo por shock endotóxico (Victor *et al.*,



2001), lo que parece indicar una mayor vulnerabilidad de los fagocitos ante situaciones de un elevado grado de oxidación.

Los resultados sobre la **capacidad antioxidante total (TAC)** en plasma muestran unos niveles elevados en los pacientes con EPOC de grado moderado y severo, especialmente en estos últimos, con respecto a los presentados por los individuos sanos. La bibliografía sobre la capacidad reductora del plasma indica que la misma disminuye con la enfermedad (Rahman *et al.*, 1996; Nadeem *et al.*, 2005; Gencer *et al.*, 2011; Ben Anes *et al.*, 2014), siendo además indicativo del desarrollo y de la progresión de la EPOC (Nadeem *et al.*, 2005; Gencer *et al.*, 2011). Por lo tanto, los menores valores serían mostrados en el estadio más grave de la enfermedad (Pirabbasi *et al.*, 2012). Sin embargo, al igual que se ha discutido en el primer, tercer y cuarto apartado de la presente tesis (5.1.3., 5.3.3. y 5.4., respectivamente), debido a la metodología empleada para valorar la TAC, sus elevados niveles podrían estar reflejando la presencia de compuestos antioxidantes como el ácido úrico que, si bien posee un carácter antioxidante, es un marcador de estrés oxidativo en varias patologías cardiovasculares como la fibrilación y la hipertensión (Tamariz *et al.*, 2014; Tosu *et al.*, 2014). Esto es debido a que su producción va acompañada por la generación de grandes cantidades de ROS a través de la xantina oxidasa (Harrison, 2004). Por lo tanto, los elevados niveles de TAC presentados por los pacientes con EPOC podrían estar indicando la existencia de un proceso compensatorio ante el elevado estado oxidativo que sufren estas personas.

La comparación realizada entre los pacientes con EPOC y los sujetos sanos de la misma edad cronológica, indica un deterioro prematuro, en tales pacientes, de las funciones analizadas en neutrófilos y linfocitos, especialmente en el grado severo de la enfermedad, semejante al que tiene lugar con el envejecimiento (Guayerbas *et al.*, 2002a; Guayerbas y De la Fuente, 2003; De la Fuente *et al.*, 2005; Puerto *et al.*, 2005; Viveros *et al.*, 2007; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; De la Fuente, 2008; De la Fuente, 2008; De la Fuente y Miquel, 2009; Arranz *et al.*, 2010a; De la Fuente, 2014; Mate *et al.*, 2014a). De hecho, las personas con EPOC presentan una comorbilidad elevada, un estado de salud deteriorado y una esperanza de vida menor (Barnes *et al.*, 2003; Wouters, 2005; Dourado *et al.*, 2006; Rabe *et al.*, 2007), lo que corrobora el uso de estos parámetros como marcadores de la velocidad de envejecimiento y de longevidad. El comportamiento funcional “envejecido” de las células

inmunitarias de los individuos con EPOC ha sido observado en todos los parámetros, a excepción de la quimiotaxis, función que aparece aumentada. Esta mayor migración inducida de los neutrófilos podría ser el resultado de la propia patogenia de la EPOC, donde los elevados niveles de IL-8 y el secuestro de los neutrófilos en la microvasculatura del pulmón desempeñan un papel clave en el daño pulmonar (MacNee, 2000; Takizawa, 2007). Además, los elevados valores observados en las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, implicados estrechamente en los procesos inflamatorios de la EPOC, principalmente a nivel pulmonar, también serían detectados en los leucocitos periféricos. Además, al poseer esos leucocitos una menor capacidad de producir/liberar IL-10, contribuirían al exacerbado estado pro-inflamatorio de los pacientes con EPOC. Por otro lado, el deterioro de la función inmunitaria podría ser debido al déficit de defensas antioxidantes, como las bajas cantidades de glutatión que se han observado en el compartimento intracelular de los leucocitos periféricos. Esto podría reflejar los elevados niveles de oxidantes, algo característico de las personas con EPOC (Rahman, 2002; Ben Anes *et al.*, 2014).

Por lo tanto, como **conclusión** se podría decir que los hombres con EPOC presentan un deterioro funcional de las células inmunitarias de sangre periférica, junto con niveles aumentados de citoquinas pro-inflamatorias y disminuidos de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y de defensas antioxidantes. En general, todos estos cambios tendrían lugar de manera dependiente de la gravedad de la enfermedad. El carácter indicativo de los parámetros funcionales valorados en la presente tesis sobre el estado de salud, la longevidad y la edad biológica, y la elevada inflamación/oxidación, indican una desregulación inmunitaria acelerada en los pacientes con EPOC en relación a sujetos sanos del mismo sexo y edad cronológica, todo lo cual hace proponer a la EPOC como un adecuado modelo de envejecimiento prematuro.

## 5.6. ENVEJECIMIENTO PATOLÓGICO. ESTUDIO LONGITUDINAL EN EL MODELO MURINO DE TRIPLE TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En los últimos años se han realizado importantes avances en la obtención de marcadores dirigidos a un diagnóstico temprano de la Enfermedad de Alzheimer (EA). Estos, aunque en el marco de la investigación, incluyen la detección de la proteína  $A\beta$  en el líquido cefalorraquídeo, y el uso de la resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones, y aunque de eficacia demostrada, poseen un carácter invasivo o son económicamente costosos (Molinuevo, 2011).

No obstante, en la última década la investigación científica ha demostrado ampliamente que el Alzheimer va acompañado de una alteración sistémica, reflejo del daño existente en el cerebro, y se han postulado numerosos posibles marcadores de la aparición y la progresión de la EA a nivel periférico, especialmente en el plasma y en las células sanguíneas, material biológico de muy fácil acceso. A este nivel, son muchos los estudios que han abordado el papel del estrés oxidativo en individuos con Alzheimer, así como el del sistema inmunológico, estando ambos muy implicados en esta enfermedad. Sin embargo, los datos sobre la alteración del sistema inmunitario son controvertidos; algunos autores apuntan hacia una funcionalidad inmunológica sobreactivada (Casal *et al.*, 2003; Town *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2014), mientras que otros postulan la existencia de una inmunosenescencia prematura en el Alzheimer (Richartz *et al.*, 2005; Richartz-Salzburger *et al.*, 2007), al comparar con individuos sanos de la misma edad. Además, dado que muchas alteraciones tienen lugar años antes de la aparición de la sintomatología típica del Alzheimer, es clave establecer qué biomarcadores podrían reflejar dicho desarrollo en beneficio de un diagnóstico precoz.

Por todo ello, el objetivo del presente apartado fue analizar en células inmunitarias peritoneales, lo que permite llevar a cabo un estudio longitudinal, de ratones de la cepa 129/C57BL6, tanto salvajes (no transgénicos, NTg) como triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (de la misma cepa salvaje, pero con los transgenes PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>Swe</sub> y tau<sub>P301L</sub>, 3xTgAD), toda una serie de marcadores de porcentajes de subpoblaciones leucocitarias, función y estrés oxidativo. Dado que esa cepa no ha sido estudiada en este contexto, aunque el objetivo principal del presente trabajo fue analizar marcadores que sirvieran de indicadores del inicio y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, también se

quiso conocer la evolución a lo largo del envejecimiento de toda una serie de parámetros que ya era conocida en otras cepas de ratones como los ICR/CD-1 y los BALB/c (Ferrández *et al.*, 1999; Medina *et al.*, 2000a; De la Fuente *et al.*, 2000; 2004b; Guayerbas *et al.* 2002a; 2002b; De la Fuente y Miquel, 2009). El análisis se inició a los 2±1 meses de vida, y se efectuó posteriormente a los 4±1, 6±1, 12±1 y 15±1 meses, momentos clave del desarrollo de la neuropatología de la EA en esta cepa: a los 2,5 meses comienza la alteración de la homeostasis neuronal; a los 3-4 meses se aprecia la inmunorreactividad frente a las placas A $\beta$  intracelulares; a los 6 meses se encuentran ya los primeros depósitos extracelulares; la alteración de la proteína tau se inicia a los 12 meses, edad en la que la patología A $\beta$  está ya bien instaurada; y finalmente a los 15 meses se observan los ONF (Oddo *et al.*, 2003a; 2003b).

A lo largo del estudio, en los momentos previos a la toma de muestra, se midieron los **pesos** de los animales con el fin de llevar un control sobre ellos, y descartar aquellos que destacaran por poseer un peso excesivamente alto o bajo en comparación con el grupo experimental al que pertenecían, hecho que no ocurrió. Tanto los 3xTgAD como los NTg fueron aumentando de peso paulatinamente desde el inicio del estudio. No se encontraron diferencias entre ambos grupos hasta la edad de 15 meses, donde los 3xTgAD mostraron un aumento significativo del peso corporal en relación a los NTg. El grupo de Knight y colaboradores (2012) encontraron, en los 3xTgAD con respecto a los NTg, un aumento significativo del peso a los 2 meses de edad, un cambio de mayor a menor peso a los 5-6 meses, y una disminución de su peso a los 12 meses. En nuestros resultados, si bien no se encontraron diferencias significativas en esas edades, los pesos de ambos grupos se distribuyeron de la misma forma que en este estudio mencionado. Sin embargo, en dicho trabajo los 3xTgAD de 18 meses siguieron presentando, al igual que a los 12 meses, menor peso. Son muchos los trabajos que indican una pérdida del peso corporal con el Alzheimer (Gillette Guyonnet *et al.*, 2007). Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que los individuos con Alzheimer son más vulnerables a padecer obesidad y diabetes (Janson *et al.*, 2004; Proffeno *et al.*, 2010), debido a desórdenes neuroendocrinos, provocados por el péptido A $\beta$  y agravados por el proceso del envejecimiento (Rauk, 2008; Bosco *et al.*, 2011; Mamelak, 2012; Talbot *et al.*, 2012). Consecuentemente, no es de extrañar que con buenas condiciones de estabulación (en grupos de 5-6 animales con un acceso *ad libitum* de comida

y agua), los animales 3xTgAD puedan pesar más. Además, cabe destacar que en el estudio anteriormente comentado emplearon machos, mientras que en el trabajo de la presente tesis fueron hembras, lo que podría contribuir a esta diferencia, dado el marcado dimorfismo sexual en la comunicación neuroinmunoendocrina que se ha demostrado en este modelo, siendo los machos los sujetos que manifiestan una senescencia inmunoendocrina más pronunciada (Giménez-Llort *et al.*, 2008).

En cuanto a la composición de las **poblaciones leucocitarias**, en los animales salvajes de la cepa 129/C57BL6 empleados en el presente estudio, se ha observado, en general, un aumento en los porcentajes peritoneales de macrófagos, linfocitos B, B1 CD5+ y T CD8+, y una disminución de linfocitos T totales, T CD4+ y T CD4+ *naïve*, desde los 6 hasta los 15 meses de edad, así como de células NK y linfocitos T CD8+ *naïve* a los 15 meses de edad en relación a las edades iniciales. Hay que puntualizar que las edades típicamente utilizadas en los estudios de envejecimiento en ratón, además de jóvenes como edad de referencia, son aquellas que se encuentran entre los 18 y 24 meses, para individuos viejos (Brubaker *et al.*, 2011). Sin embargo, el análisis de los animales empleados en el presente estudio finalizó a los 15 meses, edad en la que los ratones son considerados maduros, y por tanto no habrán alcanzado la vejez. Éste puede ser el origen de algunas discrepancias observadas con la bibliografía, especialmente en linfocitos B. En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, se observó un aumento, aunque no significativo, en el porcentaje de linfocitos B en el peritoneo de ratón de 18 meses con respecto a animales de 6 meses (Puerto *et al.*, 2005), lo que apoyaría nuestro resultado, y no la disminución señalada en la literatura en este tipo células con el envejecimiento.

La bibliografía sobre la caracterización de poblaciones leucocitarias del peritoneo de individuos con EA es inexistente, si bien se encuentran numerosos estudios en sangre periférica. En relación a los macrófagos, poco se sabe sobre su número en diversas localizaciones, aunque el aumento en los macrófagos cerebrales, la microglía, está ampliamente descrito en la EA (McGeer y McGeer, 2003). En cuanto a otras células fagocíticas, los monocitos, precursores circulantes de los macrófagos, no se ha observado diferencias entre pacientes e individuos sanos de la misma edad (Martins *et al.*, 2012), mientras que en neutrófilos periféricos se ha propuesto un aumento de sus niveles en pacientes con Alzheimer, elevación que se correlaciona con la severidad y el grado de

progresión del declive mental (Scali *et al.*, 2002). En nuestro estudio observamos unos porcentajes mayores de macrófagos peritoneales en los 3xTgAD en relación a los NTg a los 12 meses, edad clave en la fisiopatología del Alzheimer, donde la patología A $\beta$  se encontraría bien instaurada y comenzaría la alteración de la proteína *tau* (Oddo *et al.*, 2003b). En cuanto al porcentaje de células NK, los 3xTgAD mostraron unos niveles menores que los NTg tempranamente a los 2 meses y a partir de los 6 meses de edad. De la misma forma, Lombardi y colaboradores (1999) encontraron valores menores de células NK circulantes a estadios más tardíos de la enfermedad. No obstante, son muchos los trabajos en los que no se detectan diferencias en el número de las mismas (Richartz-Salzburger *et al.*, 2007; Speciale *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2012). Sin embargo, el marcaje empleado en el presente estudio para las células NK, CD335, es un receptor de citotoxicidad llamado NKp46, que se ha visto disminuido en el envejecimiento y en otras enfermedades asociadas al mismo (Camous *et al.*, 2012). Sin embargo, actualmente se desconoce cómo varía en el Alzheimer. En los resultados correspondientes a los porcentajes peritoneales de linfocitos B, no se apreciaron diferencias entre 3xTgAD y NTg, al igual que describen algunos autores sobre los niveles circulantes de este tipo celular en la EA (Araga *et al.*, 1990; Martins *et al.*, 2012). Sin embargo, existen trabajos que indican un descenso en el número de linfocitos B en pacientes con EA debido a un declive exacerbado en la hematopoyesis de estas células en medula ósea asociado al envejecimiento (Richartz-Salzburger *et al.*, 2007; Speciale *et al.*, 2007), resultado que no se observó ni en los 3xTgAD ni en los animales salvajes al avanzar la edad, como anteriormente se ha comentado. Por el contrario, se encontró un aumento de linfocitos B1 CD5+ en los 3xTgAD con respecto a los NTg a los 15 meses, aumento al que se añade el que tiene lugar debido al envejecimiento (Weksler, 2000). Los porcentajes de linfocitos T CD4+ y CD8+ peritoneales presentaron una tendencia a ser menores en los 3xTgAD en comparación con los NTg, a los 12 meses, lo que podría estar reflejando un declive prematuro en la respuesta inmunológica de los pacientes con EA, tal y como apuntan algunos autores (Richartz-Salzburger *et al.*, 2007). En cuanto a los porcentajes de células marcadas positivamente con el antígeno de diferenciación CD25, que forma parte del receptor de IL-2, numerosos autores han encontrado un aumento en la enfermedad de Alzheimer. Esto indicaría una sobreactivación y agotamiento de los linfocitos en tales pacientes, en relación a sujetos control de la misma edad, posiblemente debido al estímulo antigénico crónico producido por la A $\beta$  (Goldeck *et al.*, 2013), lo que se traduciría en un

aumento de linfocitos CD25+ de manera paralela a la progresión del Alzheimer (Lombardi *et al.*, 1999). En esta tesis, no se encontraron diferencias entre los 3xTgAD y NTg en lo que al número de linfocitos T CD4+ y T CD8+ con CD25+ se refiere, pero sí tuvo lugar un aumento de los linfocitos B CD25+ en los 3xTgAD en comparación con los NTg, lo que indicaría una mayor actividad de las células B en los individuos con Alzheimer. En cuanto a los porcentajes de células *naïve* en esta patología, se ha descrito una disminución de dichas células a favor de los linfocitos T de memoria (Town, 2005). Los 3xTgAD mostraron unos niveles menores de linfocitos T CD4+ *naïve* en relación a los NTg, especialmente a los 6 meses de edad, hecho que también se encuentra descrito en la bibliografía (Larbi *et al.*, 2009; Goldeck *et al.*, 2013), mientras que los menores porcentajes de células T CD8+ *naïve* se observaron de manera temprana a los 2 meses.

En cuanto a la **función inmunológica** de los leucocitos peritoneales, los resultados descritos en la presente tesis muestran una disminución temprana de la **quimiotaxis** de **macrófagos** y **linfocitos** de ratones 3xTgAD en relación a los NTg. Estos últimos presentan un aumento de esta función a los 4, 6 y 12 meses, disminuyendo a la edad de 15 meses, momento en que ambos grupos experimentales muestran valores similares, lo que indicaría que los individuos con Alzheimer presentan una inmunosenescencia prematura. En esta enfermedad se ha descrito que existe una potenciación, mediada por citoquinas y quimioquinas, en el reclutamiento y el paso transendotelial de células periféricas al parénquima del cerebro, especialmente de macrófagos, debido a la inflamación crónica consecuencia de la sobreactivación de la microglía (Fiala *et al.*, 1998; Hickman y El Khoury, 2010), la cual es debida al intento de colaborar en la eliminación de los depósitos  $\beta$ Ay limitar la progresión del Alzheimer (Rezai-Zadeh *et al.*, 2011; Malavolta *et al.*, 2013; Mizwicki *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que el mismo péptido  $\beta$  se caracteriza por poseer propiedades quimiotácticas (Davis *et al.*, 1992; Tiffany *et al.*, 2001). La disminuida quimiotaxis observada en la presente tesis en leucocitos peritoneales podría estar reflejando su incapacidad de hacer frente al reto inflamatorio que se presenta en la EA, al igual que se ha descrito previamente en linfocitos de bazo de animales del modelo 3xTgAD (Mate *et al.*, 2014a).

Los resultados obtenidos en el **índice de fagocitosis** de los macrófagos peritoneales, muestran una disminución de sus niveles con la edad, tanto en los animales 3xTgAD como en

los NTg, a excepción de los 12 meses de edad, donde en ambos grupos se aprecia un aumento inesperado. En la **eficacia fagocítica**, los ratones salvajes mantienen sus niveles hasta los 12 meses de edad, a partir de la cual tiene lugar una disminución asociada al envejecimiento, mientras que los 3xTgAD muestran valores menores que los NTg ya a la edad de 4 meses, la cual también se aprecia a los 6 y 15 meses de edad. La menor capacidad fagocítica de los macrófagos en los 3xTgAD, en la mayoría de las edades analizadas, seguiría apoyando la hipótesis de una inmunosenescencia prematura en los individuos con EA. En la literatura científica sobre Alzheimer, algunos autores no han encontrado diferencias en la fagocitosis de pacientes e individuos sanos de la misma edad (Song *et al.*, 1999; Beloosesky *et al.*, 2002). Sin embargo, esta similitud entre ambos grupos podría ser debido a que los pacientes se encontraban en una fase temprana de la demencia, ya que Davydova y colaboradores (2003) observaron una disminución de la actividad fagocítica, y en concreto en la fagocitosis de neutrófilos periféricos, en estadios tardíos de la enfermedad. Además, la sobreactivación de la microglía y el reclutamiento de macrófagos que presentan los pacientes con Alzheimer, podrían ser debidos a un mecanismo compensatorio por la deficiente fagocitosis del péptido A $\beta$  en estos individuos (Fiala *et al.*, 2007).

En cuanto a la **actividad citotóxica** de las células NK, tanto en los animales NTg como en los 3xTgAD, se aprecia una disminución de dicha actividad al envejecer. Además, los 3xTgAD presentan una menor actividad antitumoral que los ratones salvajes desde el inicio del estudio hasta la edad de 6 meses, a partir de la cual los valores en ambos grupos se igualan. Este resultado seguiría apoyando una inmunosenescencia prematura en los individuos con EA. Otros grupos también observaron el mismo tipo de resultado en pacientes con Alzheimer, en relación a controles de la misma edad (Araga *et al.*, 1991; Irwin *et al.*, 1991). El grupo de Prolo y colaboradores (2007) postuló que la actividad de las células NK podría servir como marcador de la progresión del Alzheimer. Es más, en base a la comunicación bidireccional entre el sistema nervioso central y el sistema inmunológico, se ha establecido una estrecha relación entre la actividad citotóxica de estas células y la alteración cognitiva (Martins *et al.*, 2012). Dado que la actividad NK es considerada como uno de los marcadores más sensibles del desajuste del sistema neuroinmunoendocrino (Fiserová *et al.*, 2002; Mocchegiani y Malavolta, 2004), los resultados obtenidos podrían estar reflejando una



deficiente homeostasis y por tanto, una salud deteriorada en los ratones 3xTgAD, lo que conduciría a mayores infecciones víricas y vulnerabilidad al cáncer (Castle, 2000).

La **respuesta proliferativa** de los linfocitos, *en condiciones basales* y *de estimulación* con ConA, mitógeno más específico de los linfocitos T, son mayores en los animales 3xTgAD que en los NTg, en todas las edades estudiadas. A su vez, en presencia de LPS, mitógeno que estimula especialmente a macrófagos y linfocitos B, si bien ambos grupos experimentales muestran un mismo patrón de linfoproliferación, los 3xTgAD presentan unos valores mayores a la edad de 6 y 15 meses. En este sentido, son muchos los trabajos que apuntan a una sobre-activación sistémica de linfocitos T, mediada por el proceso inflamatorio crónico que subyace en el Alzheimer, tanto en el cerebro (Togo *et al.*, 2002; McGeer y McGeer, 2003) como en la periferia (Town *et al.*, 2005; Schindowski *et al.*, 2007), y que parece estar implicado en la neurodegeneración que se observa en esta enfermedad (Santos *et al.*, 2014). Esta información apoyaría los resultados obtenidos en la presente tesis. De la misma forma, en ensayos de proliferación con fitohemaglutinina (PHA), otro mitógeno de linfocitos T, se ha demostrado una mayor respuesta proliferativa de linfocitos periféricos de pacientes con Alzheimer (Song *et al.*, 1999; Tacconi *et al.*, 2004), aunque también se han observado resultados totalmente opuestos en estadios severos de la enfermedad (Shalit *et al.*, 1995).

A pesar de que no está bien establecido si el papel del **estrés oxidativo** en la EA forma parte de un evento primario o secundario, son muchas las evidencias que indican su fuerte implicación en la aparición, progresión y patogénesis de la enfermedad (Coyle y Puttfarcken, 1993; Markesbery, 1997; Butterfield, 1997; Zhu *et al.*, 2007; Viña *et al.*, 2011). La existencia de numerosas fuentes de radicales libres y de lesiones asociadas al daño oxidativo que se observa en el cerebro con EA apoyan este hecho (Butterfield, 1997; Christen, 2000; Miranda *et al.*, 2000; McGeer y McGeer, 2003). Además, se ha comprobado que la A $\beta$  en sí misma es un prooxidante, lo que la convertiría, al menos en parte, en responsable de esa sobreproducción de ROS (Butterfield, 1997). Esta oxidación provocaría la muerte neuronal, lo que conduciría al desarrollo y la progresión del Alzheimer (Jana y Pahan, 2004). Así, este desbalance en el estado redox estaría mediado por un aumento en la producción de radicales libres y una disminución en la actividad de enzimas y compuestos antioxidantes, no sólo a nivel cerebral sino también a nivel periférico (Miranda *et al.*, 2000; Karelson *et al.*,

2001; Rinaldi *et al.*, 2003; Leutner *et al.*, 2005; Puertas *et al.*, 2012), al igual que ocurre con el envejecimiento, como ha sido ya comentado.

En la presente tesis, no se han observado diferencias significativas en los niveles de la forma oxidada del glutatión, **GSSG**, en los leucocitos peritoneales, ni al avanzar la edad, ni en los ratones 3xTgAD. Por otro lado, su forma reducida o **GSH** aparece con valores constantes en los animales 3xTgAD a lo largo de todo el estudio, siendo menores a los obtenidos en los NTg, diferencia que fue disminuyendo a medida que avanzó la edad, hasta presentar unos valores similares a los 15 meses. Estos datos concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo de investigación en bazo y timo de animales NTg y 3xTgAD de 15 meses de edad (Giménez-Llort *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2011). Así, en los 3xTgAD, los valores del cociente GSSG/GSH fueron muy superiores a los mostrados por los NTg ya desde la edad de 2 meses, y continuaron siendo mayores hasta los 15 meses, donde ambos valores se igualaron. Como ya se ha comentado anteriormente, el ciclo del glutatión es uno de los sistemas antioxidantes intracelulares más importantes y esenciales en la defensa contra los radicales libres, cuyo papel ha sido ampliamente estudiado en el Alzheimer. Cabe destacar que un gran número de trabajos apoyan la aparición temprana de estrés oxidativo en la patofisiología del Alzheimer, tanto en tejidos no neuronales, por ejemplo en el plasma y en las células periféricas, como en el cerebro (Gibson y Huang, 2002; Rinaldi *et al.*, 2003; Mecocci, 2004; Migliore *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2007; Puertas *et al.*, 2012). A pesar de que en la presente tesis no se ha observado un aumento en los niveles de GSSG, que sí ha sido descrito por algunos autores en diversas localizaciones (Baldeiras *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012), los bajos niveles de GSH encontrados en los ratones 3xTgAD, provocaron un desbalance en el cociente GSSG/GSH, el cual aparece aumentado ya desde antes del comienzo de cualquier manifestación de la patología de EA. En las publicaciones sobre EA, son muchos los investigadores que apuntan una disminución de GSH, así como un desequilibrio en el cociente GSSG/GSH en pro del GSSG, en diversas regiones del cerebro (Karelson *et al.*, 2001; Mandal *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) y en la periferia (Cecchi *et al.*, 1999; Calabrese *et al.*, 2006; Bermejo *et al.*, 2008; Kosenko *et al.*, 2012). Ghosh y colaboradores (2012) observaron unos niveles menores de GSH en neuronas del córtex e hipocampo de ratones 3xTgAD en relación a los NTg a partir de los 4 meses de edad, al igual que se ha reproducido en los leucocitos peritoneales empleados en el presente estudio.

Además, estos autores encontraron que esta disminución era debida a los bajos niveles de NAD(P)H y a su baja capacidad de regeneración en los 3xTgAD ya desde edades muy tempranas, como los 2 meses. Este desequilibrio en el cociente GSSG/GSH podría ser el resultado de una cadena respiratoria mitocondrial defectuosa debido a la acción del péptido A $\beta$  sobre sus complejos, provocando una excesiva producción de radicales libres (Bobba *et al.*, 2013), hecho que se ha observado, por ejemplo, en linfocitos periféricos (Leuner *et al.*, 2012). Por otra parte, en linfocitos de sangre periférica de pacientes con EA se ha detectado una mayor activación del NF- $\kappa$ B, que en personas sanas de la misma edad, parámetro que se correlacionó con el deterioro cognitivo (Ascolani *et al.*, 2012). Este factor de transcripción, que como ya se ha mencionado anteriormente, se activa en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias y estrés oxidativo, es, a su vez, inductor de estrés oxidativo ya que provoca la expresión de genes implicados en la respuesta inmunológica e inflamatoria. Hay que tener en cuenta que si bien unos niveles de activación apropiados son necesarios para una adecuada homeostasis celular, una activación persistente podría ser deletérea (Ginn-Pease y Whisler, 1998).

En cuanto a la actividad de **xantina oxidasa**, los 3xTgAD presentan unos valores mayores que los NTg a lo largo de las edades estudiadas, salvo a los 2 meses, momento en el que ambos grupos experimentales muestran actividades similares de la enzima. Arranz y colaboradores (2010a) apreciaron un aumento, con la edad, en la actividad de xantina oxidasa en células peritoneales de ratones ICR/CD-1 de 17 meses de edad. En el estudio llevado a cabo en la presente tesis, no se aprecia dicho aumento en los animales salvajes, posiblemente por haberse concluido la valoración a los 15 meses. En los 3xTgAD, los altos niveles observados en la actividad de esta enzima citoplasmática, importante fuente de radicales libres, como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, e inductor de muerte celular (Harrison, 2002), apoyaría la presencia de un elevado estrés oxidativo desde estadios tempranos de la enfermedad. En la patogénesis de la EA, la neurotoxicidad asociada a la formación de las placas A $\beta$  conlleva la alteración de la homeostasis del Ca<sup>++</sup>, provocando un aumento de sus niveles citoplasmáticos y promoviendo, consecuentemente, la producción de radicales libres por enzimas sensibles a dicho catión, como es la xantina oxidasa (Hölscher, 1998; Shibata y Kobayashi, 2008). Por ello, el aumento de actividad de esta enzima a un nivel periférico, reflejaría un estado oxidativo sistémico en los individuos con

Alzheimer. De hecho, en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación en hembras 3xTgAD de 6 meses, se observó también un aumento de la actividad de xantina oxidasa en bazo, timo y corazón en relación a animales NTg (Vida *et al.*, 2009; Giménez-Llort *et al.*, 2012).

Con respecto a la actividad de la **catalasa** los resultados obtenidos en los ratones salvajes muestran una ausencia de cambio en dicha actividad con la edad hasta los 15 meses, momento en el que se observó una disminución de la misma. En las células de los ratones 3xTgAD, se apreció una actividad menor que en las de los NTg a los 6 y 12 meses de edad, pero no tuvo lugar la disminución asociada al envejecimiento que presentaban los NTg. Esta enzima antioxidante que convierte el peróxido de hidrógeno en agua, ha sido ampliamente descrita por poseer una actividad disminuida en individuos con Alzheimer, en diversas localizaciones como el cerebro (Omar *et al.*, 1999), especialmente, en aquellas regiones donde los cambios fisiopatológicos son más severos, como la corteza frontal y la temporal (Marcus *et al.*, 1998), así como en el plasma y en células sanguíneas (Kharrazi *et al.*, 2008; Puertas *et al.*, 2012). Esto demostraría un sistema de defensa antioxidante defectuoso, al igual que se ha encontrado en los leucocitos peritoneales de los animales con Alzheimer estudiados en la presente tesis.

En cuanto a la **esperanza de vida media**, las curvas de supervivencia reflejaron una esperanza de vida menor en los animales 3xTgAD que en los NTg. En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, se observó también una mayor mortalidad en los 3xTgAD en relación a los NTg (Mate *et al.*, 2014a). Además, en un modelo transgénico de ratón que sobreexpresa APP, comprobaron un aumento de la mortalidad a mayores cantidades de A $\beta$  (Hsiao *et al.*, 1995). También, en pacientes con EA se ha descrito una menor esperanza de vida (Brodsky *et al.*, 2012), especialmente en aquellos que desarrollan la enfermedad a edades tempranas (Larson *et al.*, 2004), siendo este Alzheimer similar al del modelo de ratón transgénico empleado en la presente tesis, que igualmente muestra una menor longevidad.

Este es el primer estudio que caracteriza, además, en una manera longitudinal, el envejecimiento de la cepa salvaje 129/C57BL6 y del modelo transgénico para la EA de esta misma cepa, en términos de función y estrés oxidativo de leucocitos peritoneales. Debido al diseño experimental planteado, donde las tomas de muestra se realizaron en edades claves

en la progresión del Alzheimer, no se ha llegado a estudiar las funciones indicadas de los leucocitos peritoneales hasta el completo envejecimiento de los animales. Sin embargo, en términos generales se podría decir que, la dinámica que presentan los parámetros analizados en la cepa salvaje 129/C57BL6 de la presente tesis, con el avance de la edad, concuerdan con la observada en los leucocitos peritoneales y en aquellos de otras localizaciones, como el bazo, el timo y los nódulos axilares, procedentes de distintas cepas de ratón, como ICR/CD-1 y BALB/c (Medina *et al.*, 2000a; De la Fuente *et al.*, 2002; Puerto *et al.*, 2005; Arranz *et al.*, 2010a; Vida *et al.*, 2011) y de rata (De la Fuente *et al.*, 2004a), así como en neutrófilos y linfocitos de sangre periférica humana (Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008) al avanzar la edad.

En relación al modelo murino de Alzheimer empleado en presente estudio, hay que indicar que los únicos trabajos existentes sobre la funcionalidad y el estado redox de las células inmunitarias periféricas son dos estudios transversales llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en bazo y timo de animales NTg y 3xTgAD de distintas edades (Giménez-Llort *et al.*, 2008; Mate *et al.*, 2014a). En la presente tesis, gracias a la utilización del peritoneo, muestra que puede ser obtenida sin el sacrificio de los animales y, por tanto, permite el seguimiento longitudinal de los mismos, se ha podido conocer la longevidad y los cambios que tienen lugar en los leucocitos a lo largo del desarrollo de la enfermedad de cada individuo.

Pese a que está ampliamente aceptado que en la EA tiene lugar una alteración del sistema inmunitario a nivel sistémico (Town *et al.*, 2005; Richartz *et al.*, 2005; Richartz-Salzburger *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2014), los datos al respecto son controvertidos. Algunos autores apuntan a una sobreactivación de la funcionalidad inmunitaria (Town *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2014), mientras que otros postulan la existencia de un deterioro inmunitario general en pacientes con EA (Richartz *et al.*, 2005; Richartz-Salzburger *et al.*, 2007; Fiala *et al.*, 2007). Esta falta de consenso podría ser debido a la compleja modulación que tiene lugar en el sistema inmunitario con la EA, en la que las funciones de la inmunidad innata y adquirida podrían tener una regulación diferente y complementaria, lo que ha sido observado en la presente tesis. Así, los parámetros relacionados con la inmunidad innata mostraron una inmunosenescencia prematura, lo que podría resultar en una mayor susceptibilidad y vulnerabilidad a infecciones bacterianas y víricas, afecciones que aparecen

como las causas más comunes de enfermedad y muerte con el envejecimiento (Ginaldi *et al.*, 1999; Lord *et al.*, 2001; De la Fuente y Miquel, 2009). Sin embargo, los linfocitos periféricos de la inmunidad adaptativa presentaron una respuesta exacerbada, posiblemente mediada por el proceso inflamatorio crónico que tiene lugar en el Alzheimer (Town *et al.*, 2005; Schindowski *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2014).

Por otro lado, el deterioro temprano de las funciones inmunitarias en los 3xTgAD podría estar mediado por el estrés oxidativo que presentan los leucocitos peritoneales de estos animales. Como ya se ha mencionado a lo largo de la presente tesis, debido a que el sistema redox es vital para un adecuado funcionamiento de las células inmunitarias, el desajuste entre compuestos oxidantes y defensas antioxidantes, causaría un deterioro en la funcionalidad de las mismas (De la Fuente y Miquel, 2009). Por lo tanto, la EA conduciría a un profundo deterioro de las funciones de los leucocitos a través del aumento del estrés oxidativo.

De manera interesante, la alteración observada a los 4 meses de edad en algunas funciones (la *quimiotaxis de macrófagos y linfocitos* y la *fagocitosis*) y en los niveles de estrés oxidativo (la actividad *xantina oxidasa* y la cantidad de *GSH* intracelulares) en los ratones 3xTgAD, momento en el que aparece la inmunoreactividad a las fibrillas A $\beta$  intracelulares (Oddo *et al.*, 2003a; 2003b), apoyaría la existencia de una inmunosenescencia prematura en el estadio prodrómico de la enfermedad. Incluso ciertos parámetros, como el *porcentaje* y la *actividad citotóxica de las células NK*, los *porcentajes de linfocitos B CD25<sup>+</sup> y CD8 naïve*, el *contenido de GSH* y el *cociente GSSG/GSH*, mostraron unos valores alterados a la edad de 2 meses, es decir, antes del comienzo del desarrollo de la enfermedad, lo que sugiere que podrían ser buenos marcadores preclínicos. Además, dado que el sistema inmunitario es un buen indicador de salud y longevidad (Wayne *et al.*, 1990), y las funciones estudiadas en la presente tesis han sido propuestas como marcadores de edad biológica y predictores de longevidad (Guayerbas *et al.*, 2002a; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Puerto *et al.*, 2005; Viveros *et al.*, 2007; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; De la Fuente, 2008; De la Fuente y Miquel, 2009; Arranz *et al.*, 2010a; De la Fuente, 2014; Mate *et al.*, 2014a), los resultados obtenidos explicarían la menor esperanza de vida de los ratones 3xTgAD empleados en el presente estudio, al igual que muestran los pacientes con Alzheimer (Brodsky *et al.*, 2012). Es más, a la edad de 15 meses, algunos parámetros como el *porcentaje de linfocitos B1*

*CD5+*, la *fagocitosis*, la *linfoproliferación* y la *actividad de xantina oxidasa* continuaron mostrando unos niveles alterados en los 3xTgAD en comparación a los NTg, valores que podrían estar relacionados con la mortalidad, ya que dichos animales comenzaron a morir de manera natural a esa edad.

Los presentes resultados tienen especial relevancia, al menos para el Alzheimer denominado familiar, al sugerir que las alteraciones inmunitarias sistémicas que muestran los pacientes, podrían ser no sólo un fenómeno secundario al daño en el cerebro, sino estar causalmente relacionadas con la patología y contribuir a su desarrollo a nivel central, exacerbando la alteración glial. Aunque el presente modelo murino reproduce la EA de tipo hereditario o familiar, y no la esporádica, forma más prevalente de los casos de Alzheimer en humanos, el deterioro oxidativo y funcional acelerado y pronunciado del sistema inmunológico que tiene lugar a edades muy tempranas en los 3xTgAD, hace pensar que debería profundizarse en los parámetros inmunitarios analizados para intentar detectar marcadores predictivos y de progresión de la enfermedad, algo en lo que se están focalizando las investigaciones centradas en la EA, en los últimos años. Así, dado que las células inmunitarias del peritoneo de ratón y aquellas presentes en la circulación humana muestran, con el envejecimiento, una evolución similar en cuanto a su funcionalidad y estado de estrés oxidativo (De la Fuente y Miquel, 2009), el estudio amplio y en profundidad de los leucocitos de sangre periférica humana, muestra de muy fácil acceso, en personas con probabilidades elevadas de desarrollar la EA, sería un objetivo interesante a llevar a cabo en un futuro inmediato. De este modo, se podría determinar si los resultados obtenidos en el modelo murino empleado en la presente tesis son extrapolables a la EA en humanos.

Por lo tanto, se podría **concluir** que los ratones triple transgénicos para la EA muestran un deterioro prematuro de la función inmunitaria y de parámetros de estrés oxidativo, alteraciones que pueden ser los responsables, al menos en parte, de su menor esperanza de vida. Además, la valoración de parámetros del sistema inmunitario y del estrés oxidativo a nivel periférico, podría ser propuesta para la detección de marcadores periféricos del estadio preclínico y prodrómico, y de la progresión de la EA.

# Conclusiones





A continuación se indican las conclusiones que pueden extraerse de la presente tesis:

En relación al primer objetivo, *“Analizar una serie de funciones así como diversos parámetros de inflamación y oxidación en las células inmunitarias de sangre periférica, en el sobrenadante de cultivos de leucocitos y en el plasma de una amplia muestra de hombres y mujeres de edad adulta, adulta-madura y madura”*, puede concluirse que:

**1. Con el envejecimiento, los neutrófilos y los linfocitos de sangre periférica humana muestran unas capacidades funcionales deterioradas y una desregulación en la liberación de citoquinas. Todo ello puede contribuir al estado de inflamación de la vejez. A su vez, al avanzar la edad, existe un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en células sanguíneas y plasma, por un aumento de los primeros. Los resultados parecen indicar la validez de la mayoría de los parámetros analizados como marcadores de edad biológica, especialmente en las mujeres.**

Con respecto al segundo objetivo de la presente tesis, *“Estudiar los efectos de los ritmos circadianos y circanuales en una serie de características del sistema inmunitario humano, así como el impacto del envejecimiento sobre tales efectos”*, las conclusiones que se extraen son las siguientes:

**2. La funcionalidad de las células inmunitarias presenta variaciones circadianas y circanuales, que se modifican con el envejecimiento. A las 15:00h y en invierno existe un deterioro en dicha funcionalidad, especialmente en los linfocitos de las personas mayores. Así, el momento del día y del año en el que se realiza una analítica son factores importantes a tener en cuenta a la hora de valorar e interpretar los resultados.**

En lo referente al tercer objetivo, *“Caracterizar diversos parámetros de función inmunitaria y de defensa antioxidante en una población de hombres y mujeres nonagenarios, como posible modelo de envejecimiento saludable”*, se puede concluir que:

**3a.** Los nonagenarios conservan una funcionalidad de las células inmunitarias semejante a la de los adultos, lo que acredita a las funciones estudiadas como marcadores de longevidad. La evolución de una misma citoquina difiere con el envejecimiento en función del contexto fisiológico en el que son obtenidas. Así, la secreción en presencia de PHA por las células mononucleares de los nonagenarios es similar a la de los adultos, especialmente en los hombres. No obstante, las pro-inflamatorias secretadas por el conjunto de las células sanguíneas, en presencia de LPS, es mayor en nonagenarios que en individuos septuagenarios. Estos resultados junto con aquellos obtenidos del primer objetivo de la presente tesis indican que los monocitos y especialmente los neutrófilos parecen tener un papel clave en el estado de “inflamm-aging”.

**3b.** Los hombres nonagenarios presentan un sistema inmunitario más preservado que las mujeres, en cuanto a su función y secreción de citoquinas. No obstante, las mujeres nonagenarias liberan unas cantidades de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 similares a las adultas. Todo ello indica que el género es un factor a tener en cuenta a la hora de analizar individuos longevos.

Con respecto al cuarto objetivo consistente en, *“Analizar los niveles de antioxidantes totales plasmáticos en una amplia población de personas mayores de 65 años pertenecientes al Estudio Toledo para un Envejecimiento Saludable con el fin de establecer posibles correlaciones entre la cantidad de tales antioxidantes y diversas características y patologías que se encuentran asociados con el envejecimiento y/o la fragilidad”*, se indica la siguiente conclusión:

**4.** La capacidad antioxidante total valorada en la presente tesis, más que un marcador del estado antioxidante del organismo, podría ser un buen indicador de estrés oxidativo en ciertas situaciones fisiológicamente adversas. Sin embargo, esta utilización sería aplicable únicamente en las mujeres.

En relación al quinto objetivo, *“Analizar diversos parámetros de funcionalidad de leucocitos de sangre periférica, incluyendo niveles de citoquinas, y de defensa antioxidante en un grupo de hombres con EPOC de grado moderado y severo en comparación con sujetos sanos de la misma edad cronológica, para poder establecer a los pacientes con EPOC como un posible modelo de envejecimiento prematuro asociado a una patología, además de detectar posibles marcadores del desarrollo de la enfermedad”*, puede concluirse que:

**5. Los hombres con EPOC presentan un deterioro funcional de las células inmunitarias de sangre periférica, junto con niveles aumentados de citoquinas pro-inflamatorias y disminuidos de la anti-inflamatoria IL-10 y de defensas antioxidantes. En general, todos estos cambios tendrían lugar de manera dependiente de la gravedad de la enfermedad. Estos resultados sugieren una inmunosenescencia prematura en las personas con esta enfermedad.**

Por último, en lo referente al sexto objetivo, *“Analizar, en un modelo murino triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer, mediante un estudio longitudinal iniciado a edades tempranas, los cambios en diversos parámetros funcionales y de estrés oxidativo en leucocitos peritoneales, así como relacionarlos con la longevidad”*, se concluye que:

**6. Los ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer muestran un deterioro prematuro de la función y del estado redox de las células inmunitarias peritoneales, alteraciones que pueden ser los responsables, al menos en parte, de su menor esperanza de vida. La valoración del sistema inmunitario y su estado de estrés oxidativo a nivel periférico, se propone como marcador para la detección del estadio preclínico y prodrómico, y de la progresión de la enfermedad de Alzheimer.**



# Referencias



- Abdullah A, Ssefer V, Ertugrul U, Osman E, Esref A, Ugur CM, Adalet A, Yavuz Y, Faysal E, Nebahat T. Evaluation of serum oxidant/antioxidant balance in patients with acute stroke. *J Pak Med Assoc* 2013; 63: 590-3.
- Abe N, Kashima Y, Izawa A, Motoki H, Ebisawa S, Miyashita Y, Imamura H, Ikeda U. A 2-year follow-up of oxidative stress levels in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: A subanalysis of the ALPS-AMI Study. *Angiology* 2014; En prensa.
- Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY. The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 2001; 12: 435–40.
- Aejmelaeus RT, Holm P, Kaukinen U, Metsä-Ketelä TJ, Laippala P, Hervonen AL, Alho HE. Age-related changes in the peroxyl radical scavenging capacity of human plasma. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 69-75.
- Agustí AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21: 347-60.
- Ahluwalia N, Mastro AM, Ball R, Miles MP, Rajendra R, Handte G. Cytokine production by stimulated mononuclear cells did not change with aging in apparently healthy, well-nourished women. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1269-79.
- Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, Gant TW, Hastings MH, Kyriacou CP. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 2002; 12: 540-50.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 383–421.
- Alberti S, Cevenini E, Ostan R, Capri M, Salvioli S, Bucci L, Ginaldi L, De Martinis M, Franceschi C, Monti D. Age dependent modifications of type 1 and type 2 cytokines within virgin and memory CD4+ T cells in humans. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 560–6.
- Allman D, Miller JP. B cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 463-7.
- Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, Falcão RR, Abdelhay E, Bouzas LF, Thuler LC, Ornellas MH, Diamond HR. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol* 2011; 72: 319-29.
- Alonso-Fernández P, De la Fuente M. Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci* 2011; 4: 78-100.



- Alonso-Fernández P, Maté I, De la Fuente M. Influential factors over the functional and redox parameters in neutrophils. En: Alonso-Fernández P, Maté I, De la Fuente M, Eds. Neutrophils in biological age and longevity. New York: Nova Science Publishers, Inc. 2010; pp. 41-5.
- Alonso-Fernández P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, De la Fuente M. Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatr Soc* 2008; 56: 2244-51.
- Alvarado C, Álvarez P, Jiménez L, De la Fuente M. Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. *Dev Comp Immunol* 2006a; 30: 1168-80.
- Alvarado C, Álvarez P, Puerto M, Gausserès N, Jiménez L, De la Fuente M. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 2006b; 22: 767-77.
- Álvarez-Rodríguez L, López-Hoyos M, Muñoz-Cacho P, Martínez-Taboada VM. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol* 2012; 273: 124-32.
- American Thoracic Society. Cigarette smoking and health. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 861-5.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858-62.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 7915-22.
- Annunziato F, Romagnani S. Heterogeneity of human effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 257.
- Araga S, Kagimoto H, Funamoto K, Takahashi K. Lymphocyte proliferation and subpopulations in dementia of the Alzheimer type. *Jpn J Med* 1990; 29: 572-5.
- Araga S, Kagimoto H, Funamoto K, Takahashi K. Reduced natural killer cell activity in patients with dementia of the Alzheimer type. *Acta Neurol Scand* 1991; 84: 259-63.
- Aranda R, Doménech E, Rus AD, Real JT, Sastre J, Viña J, Pallardó FV. Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free Radic Res* 2007; 41: 1995–2000.
- Argentati K, Re F, Donnini A, Tucci MG, Franceschi C, Bartozzi B, Bernardini G, Provinciali M. Numerical and functional alterations of circulating gammadelta T lymphocytes in aged people and centenarians. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 65-71.
- Arjona A, Sarkar DK. Are circadian rhythms the code of hypothalamis-immune communication? Insights from natural killer cells. *Neurochem Res* 2008; 33: 708-18.

- Arranz L, Caamaño JH, Lord JM, De la Fuente M. Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor-kappa  $\beta$ . *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010a; 65: 941-50.
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I, Giménez-Llort L, De la Fuente M. Effect of environmental enrichment on the immunoendocrine aging of male and female triple-transgenic 3xTgAD mice for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2011; 25: 727-37.
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I, Maté I, Viveros MP, De la Fuente M. Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res* 2010b; 13: 415-28.
- Arranz L, De Vicente A, Muñoz M, De la Fuente M. Impairment of immune function in the social excluded homeless population. *Neuroimmunomodulation* 2009; 16: 251-60.
- Arranz L, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1252-62.
- Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M. Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* 2007; 62: 1-8.
- Arranz L, Lord JM, De la Fuente M. Preserved ex vivo inflammatory status and cytokine responses in naturally long-lived mice. *Age* 2010c; 32: 451-66.
- Ascolani A, Balestrieri E, Minutolo A, Mosti S, Spalletta G, Bramanti P, Mastino A, Caltagirone C, Macchi B. Dysregulated NF- $\kappa$ B pathway in peripheral mononuclear cells of Alzheimer's disease patients. *Curr Alzheimer Res* 2012; 9: 128-37.
- Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, Siegel G, Bergman A, Huffman DM, Schechter CB, Wright WE, Shay JW, Barzilai N, Govindaraju DR, Suh Y. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 1710-7.
- Aujard F, Herzog ED, Block GD. Circadian rhythms in firing rate of individual suprachiasmatic nucleus neurons from adult and middle-aged mice. *Neurosci* 2001; 106: 255-61.
- Austad SN. Why women live longer than men: sex differences in longevity. *Gend Med* 2006; 3: 79-92.
- Avila-Funes JA, Helmer C, Amieva H, Barberger-Gateau P, Le Goff M, Ritchie K, Portet F, Carrière I, Tavernier B, Gutiérrez-Robledo LM, Dartigues JF. Frailty among community-dwelling elderly people in France: the three-city study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008; 63: 1089-96.
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93: 1464-76.

- Bae ChY, Kang YG, Kim S, Cho Ch, Kang HCh, Yu BY, Lee SW, Cho KH, Lee DCh, Lee K, Kim JS, Shin KK. Development of models for predicting biological age (BA) with physical, biochemical and hormonal parameters. *Arch Gerontol Geriatr* 2008; 47: 253-65.
- Baeza I, De Castro NM, Arranz L, Fdez-Tresguerre J, De la Fuente M. Ovariectomy causes immunosenescence and oxi-inflamm-aging in peritoneal leukocytes of aged female mice similar to that in aged males. *Biogerontology* 2011; 12: 227-38.
- Baeza I, De Castro NM, Giménez-Llort L, De la Fuente M. Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *J Neuroimmunol* 2010; 219: 90-9.
- Bagasra O, Howedy A, Kajdacsy-Balla A. Macrophage function in chronic experimental alcoholism. I. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunology* 1988; 65: 405-9.
- Bai X, Han L, Liu Q, Shan H, Lin H, Sun X, Chen XM. Evaluation of biological age process – a population-based study of healthy people in China. *Gerontology* 2010; 56: 129-40.
- Bains JS, Shaw CA. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Rev* 1997; 25: 335–58.
- Baldeiras I, Santana I, Proença MT, Garrucho MH, Pascoal R, Rodrigues A, Duro D, Oliveira CR. Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2008; 15: 117-28.
- Bale TL. Neuroendocrine and immune influences on the CNS: it's a matter of sex. *Neuron* 2009; 64: 13-6.
- Bao AM, Meynen G, Swaab DF. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev* 2008; 57: 531-53.
- Baptista G, Dupuy AM, Jaussent A, Durant R, Ventura E, Sauguet P, Picot MC, Jeandel C, Cristol JP. Low-grade chronic inflammation and superoxide anion production by NADPH oxidase are the main determinants of physical frailty in older adults. *Free Radic Res* 2012; 46: 1108-14.
- Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J Res Med Sci* 2014; 19: 358-67.
- Barak Y. The immune system and happiness. *Autoimmun Rev* 2006; 5: 523-27.
- Barbieri M, Rizzo MR, Manzella D, Grella R, Ragno E, Carbonella M, Abbatecola AM, Paolisso G. Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians. *Exp Gerontol* 2003; 38: 137-43.
- Barceló B, Pons J, Fuster A, Sauleda J, Noguera A, Ferrer JM, Agustí AG. Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol* 2006; 145: 474-9.

- Barja G. Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Rad Biol Med* 2002; 33: 1167-72.
- Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 2004; 27: 595-600.
- Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672-88.
- Barrientos RM, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Characterization of the sickness response in young and aging rats following *E. Coli* infection. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 450-4.
- Bartosz G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radic Res* 2010; 44: 711-20.
- Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med* 1991; 173: 771-4.
- Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952; 195: 133-40.
- Beharka AA, Meydani M, Wu D, Leka LS, Meydani A, Meydani SN. Interleukin-6 production does not increase with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 56: B81-8.
- Bellinger DL, Madden KS, Lorton D, Thyagarajan S, Felten DL. Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence. En: Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press 2001; pp. 241-86.
- Belmin J, Bernard C, Corman B, Merval R, Esposito B, Tedgui A. Increased production of tumor necrosis factor and interleukin-6 by arterial wall of aged rats. *Am J Physiol* 1995; 268: H2288-93.
- Beloosesky Y, Salman H, Bergman M, Bessler H, Djaldetti M. Cytokine levels and phagocytic activity in patients with Alzheimer's disease. *Gerontology* 2002; 48: 128-32.
- Ben Anes A, Fetoui H, Bchir S, Ben Nasr H, Chahdoura H, Chabchoub E, Yacoub S, Garrouch A, Benzarti M, Tabka Z, Chahed K. Increased oxidative stress and altered levels of nitric oxide and peroxynitrite in tunisian patients with chronic obstructive pulmonary disease: correlation with disease severity and airflow obstruction. *Biol Trace Elem Res* 2014; 161: 20-31.
- Ben Moussa S, Sfaxi I, Tabka Z, Ben Saad H, Rouatbi S. Oxidative stress and lung function profiles of male smokers free from COPD compared to those with COPD: a case-control study. *Libyan J Med* 2014; 9: 23873.
- Bentivoglio M, Deng XH, Nygård M, Sadki A, Kristensson K. The aging suprachiasmatic nucleus and cytokines: functional, molecular, and cellular changes in rodent. *Chronobiol Int* 2006; 23: 437-49.

- Berger J, Slapnicková M. Circadian structure of rat neutrophil phagocytosis. *Comp Clin Path* 2003; 12: 84-9.
- Bergman H, Ferrucci L, Guralnik J, Hogan DB, Hummel S, Karunananthan S, Wolfson C. Frailty: an emerging research and clinical paradigm--issues and controversies. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62: 731-7.
- Bermejo P, Martín-Aragón S, Benedí J, Susín C, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM. Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment. *Free Radic Res* 2008; 42: 162-70.
- Berr C, Balansard B, Arnaud J, Roussel AM, Alpérovitch A. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. *Etude du Vieillissement Artériel. J Am Geriatr Soc* 2000; 48: 1285-91.
- Besedovsky HO, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrin Rev* 1996; 17: 64-102.
- Besedovsky HO, Del Rey A. Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun* 2007; 21: 34-44.
- Besedovsky HO, Del Rey A. Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res* 2011; 36: 1-6.
- Beyer I, Mets T, Bautmans I. Chronic low-grade inflammation and age-related sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012; 15: 12-22.
- Beynon AL, Thome J, Coogan AN. Age and time of day influences on the expression of transforming growth factor-beta and phosphorylated SMAD3 in the mouse suprachiasmatic and paraventricular nuclei. *Neuroimmunomodulation* 2009; 16: 392-9.
- Biasi D, Carletto A, Dell'Agnola C, Caramaschi P, Montesanti F, Zavateri G, Zeminian S, Bellavite P, Bambara LM. Neutrophil migration, oxidative metabolism, and adhesion in elderly and young subjects. *Inflammation* 1996; 20: 673-81.
- Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Buffon A, Summaria F, Ginnetti F, Fadda G, Maseri A. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 23: 855-60.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 2005; 45: 675-88.
- Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J Immunol* 1984; 132: 1067-70.
- Blask DE. Melatonin, sleep disturbance and cancer risk. *Sleep Med Rev* 2009; 13: 257-64.
- Blask DE, Hill SM, Dauchy RT, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L, Dauchy E, Sauer LA. Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human

- breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. *J Pineal Res* 2011; 51: 259-69.
- Blasko I, Grubeck-Loebenstein B. Role of the immune system in the pathogenesis, prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Drugs Aging* 2003; 20: 101-13.
- Blidberg K, Palmberg L, Dahlén B, Lantz AS, Larsson K. Increased neutrophil migration in smokers with or without chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 2012; 17: 854-60.
- Blidberg K, Palmberg L, James A, Billing B, Henriksson E, Lantz AS, Larsson K, Dahlén B. Adhesion molecules in subjects with COPD and healthy non-smokers: a cross sectional parallel group study. *Respir Res* 2013; 14: 47.
- Blom JM, Gerber JM, Nelson RJ. Day length affects immune cell numbers in deer mice: interactions with age, sex, and prenatal photoperiod. *Am J Physiol* 1994; 267: R596-601.
- Bobba A, Amadoro G, Valenti D, Corsetti V, Lassandro R, Atlante A. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by  $\beta$ -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion* 2013; 13: 298–311.
- Boivin DB, James FO, Wu A, Cho-Park PF, Xiong H, Sun ZS. Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 2003; 102: 4143–5.
- Bonafè M, Barbi C, Storci G, Salvioli S, Capri M, Olivieri F, Valensin S, Monti D, Gonos ES, De Benedictis G, Franceschi C. What studies on human longevity tell us about the risk for cancer in the oldest old: data and hypotheses on the genetics and immunology of centenarians. *Exp Gerontol* 2002; 37: 1263-71.
- Bonafè M, Olivieri F, Cavallone L, Giovagnetti S, Mayegiani F, Cardelli M, Pieri C, Marra M, Antonicelli R, Lisa R, Rizzo MR, Paolisso G, Monti D, Franceschi C. A gender--dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2357-61.
- Bonotis K, Krikki E, Holeva V, Aggouridaki C, Costa V, Baloyannis S. Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. *J Neuroimmunol* 2008; 193: 183-7.
- Borkan A, Norris AH. Assessment of biological age using a profile of physical parameters. *J Gerontol* 1980; 35: 177-84.
- Bosco D, Fava A, Plastino M, Montalcini T, Pujia A. Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 1807-21.
- Boxer R, Kleppinger A, Ahmad A, Annis K, Hager D, Kenny A. The 6-minute walk is associated with frailty and predicts mortality in older adults with heart failure. *Congest Heart Fail* 2010; 16: 208-13.
- Boyd SD, Liu Y, Wang C, Martin V, Dunn-Walters DK. Human lymphocyte repertoires in ageing. *Curr Opin Immunol* 2013; 25: 511-5.

- Boyden SV. The chemotaxis effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962; 115: 453-6.
- Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 320-6.
- Britschgi M, Wyss-Coray T. Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol* 2007; 82: 205-33.
- Brodsky H, Seeher K, Gibson L. Dementia time to death: a systematic literature review on survival time and years of life lost in people with dementia. *Int Psychogeriatr* 2012; 24: 1034-45.
- Brubaker AL, Palmer JL, Kovacs EJ. Age-related dysregulation of inflammation and innate immunity: lessons learned from rodent models. *Aging Dis* 2011; 2: 346-60.
- Brubaker AL, Rendon JL, Ramirez L, Choudhry MA, Kovacs EJ. Reduced neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of cutaneous wound infection with advanced age. *J Immunol* 2013; 190: 1746-57.
- Brunsgaard H. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in elderly populations. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13: 389-91.
- Brunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Hjelmberg Jv, Pedersen BK, Jeune B. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am J Med* 2003a; 115: 278-83.
- Brunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Pedersen AN, Skinhoj P, Pedersen BK. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999a; 54A: M357-64.
- Brunsgaard H, Ladelund S, Pedersen AN, Schroll M, Jørgensen T, Pedersen BK. Predicting death from tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in 80-year-old people. *Clin Exp Immunol* 2003b; 132: 24-31.
- Brunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhøj P, Pedersen BK. Impaired production of proinflammatory cytokines in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation in elderly humans. *Clin Exp Immunol* 1999b; 118: 235-41.
- Brunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhøj P, Pedersen BK. Proliferative responses of blood mononuclear cells (BMNC) in a cohort of elderly humans: role of lymphocyte phenotype and cytokine production. *Clin Exp Immunol* 2000a; 119: 433-40.
- Brunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhøj P, Pedersen BK. TNF-alpha, leptin, and lymphocyte function in human aging. *Life Sci* 2000b; 67: 2721-31.
- Brunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhøj P, Pedersen BK. Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans. *Exp Gerontol* 2001; 37: 127-36.

- Bruunsgaard H, Skinhøj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor- $\alpha$  and atherosclerosis. *Clin exp immunol* 2000c; 121: 255-60.
- Bryl E, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. Down-regulation of CD28 expression by TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 2001; 167: 3231-8.
- Buijs RM, Kalsbeek A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Rev Neurosci* 2001; 2: 521–6.
- Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and autonomic nervous system. *J Endocrinol* 2003; 177: 17–26.
- Buizza L, Cenini G, Lanni C, Ferrari-Toninelli G, Prandelli C, Govoni S, Buoso E, Racchi M, Barcikowska M, Styczynska M, Szybinska A, Butterfield DA, Memo M, Uberti D. Conformational altered p53 as an early marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *PLoS One* 2012; 7: e29789.
- Buko IV, Polonetskiĭ LZ, Mrochek AG, Moĭseenok AG. [Antioxidant status and glutathione redox potential of erythrocytes in patients with acute coronary syndrome]. *Ukr Biokhim Zh* 2014; 86: 114-24.
- Burchill MA, Yang J, Vang KB, Farrar MA. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol Lett* 2007; 114: 1-8.
- Burnett D, Chamba A, Hill SL, Stockley RA. Neutrophils from subjects with chronic obstructive lung disease show enhanced chemotaxis and extracellular proteolysis. *Lancet* 1987; 2: 1043-6.
- Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, O'Mahony D, Lord JM. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 881-6.
- Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension* 2000; 35: 746-51.
- Butterfield DA. beta-Amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Chem Res Toxicol* 1997; 10: 495-506.
- Butts CL, Sternberg EM. Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cell Immunol* 2008; 252: 7-15.
- Caccamo A, Maldonado MA, Bokov AF, Majumder S, Oddo S. CBP gene transfer increases BDNF levels and ameliorates learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 22687–92.
- Cakman I, Rohwer J, Schütz RM, Kirchner H, Rink L. Dysregulation between TH1 and TH2 T cell subpopulations in the elderly. *Mech Ageing Dev* 1996; 87: 197-209.



- Calabrese V, Sultana R, Scapagnini G, Guagliano E, Sapienza M, Bella R, Kanski J, Pennisi G, Mancuso C, Stella AM, Butterfield DA. Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1975-86.
- Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit Rev Immunol* 1997; 17: 77-88.
- Cameron B, Landreth GE. Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2010; 37: 503–9.
- Camous X, Pera A, Solana R, Larbi A. NK cells in healthy and age-associated diseases. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 195956.
- Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J Proteomics* 2011; 74: 2313-23.
- Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 1998; 44: 1309-15.
- Cao J, Wang HY. [Association between total antioxidant status and atherosclerosis in elderly patients with essential hypertension]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2013; 41: 857-61.
- Cardinali DP, Della Maggiore V, Selgas L, Esquifino AI. Diurnal rhythm in ornithine decarboxylase activity and noradrenergic and cholinergic markers in rat submaxillary lymph nodes. *Brain Res* 1996; 711: 153–62.
- Cartier A, Côté M, Lemieux I, Périusse L, Tremblay A, Bouchard C, Després JP. Age-related differences in inflammatory markers in men: contribution of visceral adiposity. *Metabolism* 2009; 58: 1452-8.
- Caruso C, Lio D, Cavallone L, Franceschi C. Aging, longevity, inflammation, and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1028: 1-13.
- Casal JA, Robles A, Tutor JC. Serum markers of monocyte/macrophage activation in patients with Alzheimer's disease and other types of dementia. *Clin Biochem* 2003; 36: 553-6.
- Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 578-85.
- Castle SC, Uyemura K, Crawford W, Wong W, Klaustermeyer WB, Makinodan T. Age-related impaired proliferation of peripheral blood mononuclear cells is associated with an increase in both IL-10 and IL-12. *Exp Gerontol* 1999; 34: 243-52.
- Catania A, Airaghi L, Motta P, Manfredi MG, Annoni G, Pettenati C, Brambilla F, Lipton JM. Cytokine antagonists in aged subjects and their relation with cellular immunity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1997; 52: B93-7.

- Cawthon PM, Marshall LM, Michael Y, Dam TT, Ensrud KE, Barrett-Connor E, Orwoll ES; Osteoporotic Fractures in Men Research Group. Frailty in older men: prevalence, progression, and relationship with mortality. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55: 1216-23.
- Cecchi C, Latorraca S, Sorbi S, Iantomasi T, Favilli F, Vincenzini MT, Liguri G. Glutathione levels is altered in lymphoblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999; 275: 152-4.
- Cheung AK, Yan G, Greene T, Daugirdas JT, Dwyer JT, Levin NW, Ornt DB, Schulman G, Eknoyan G; Hemodialysis Study Group. Hemodialysis Study Group: Seasonal variations in clinical and laboratory variables among chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2345-52.
- Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Deguchi T, Sugiyama K, Azuma E, Sakurai M. CD4+ and CD8+ cell cytokine profiles in neonates, older children, and adults: increasing T helper type 1 and T cytotoxic type 1 cell populations with age. *Cell Immunol* 1998; 183: 149-56.
- Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 621S-9S.
- Chrousos GP. Stress and sex versus immunity and inflammation. *Sci Signal* 2010; 3: pe36.
- Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2009; 8: 18-30.
- Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 2001; 34: 50s-59s.
- Cioffi M, Esposito K, Vietri MT, Gaggero P, D'Auria A, Ardovino I, Puca GA, Molinari AM. Cytokine pattern in postmenopause. *Maturitas* 2002; 41: 187-92.
- Cirrito JR, Holtzman DM. Amyloid beta and Alzheimer disease therapeutics: the devil may be in the details. *J Clin Invest* 2003; 112: 321-3.
- Clark JA, Peterson TC. Cytokine production and aging: overproduction of IL-8 in elderly males in response to lipopolysaccharide. *Mech Ageing Dev* 1994; 77: 127-39.
- Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S, McGaugh JL, LaFerla FM. Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis* 2007; 28: 76-82.
- Cohen HJ, Pieper CF, Harris T, Rao KM, Currie MS. The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1997; 52: M201-8.
- Cojocaru IM, Cojocaru M, Sapira V, Ionescu A. Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med* 2013; 51: 97-106.
- Colonna-Romano G, Potestio M, Aquino A, Candore G, Lio D, Caruso C. Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly. *Exp Gerontol* 2002; 37: 205-11.

- Coogan AN, Wyse CA. Neuroimmunology of the circadian clock. *Brain Res* 2008; 1232: 104-12.
- Cooper C, Dere W, Evans W, Kanis JA, Rizzoli R, Sayer AA, Sieber CC, Kaufman JM, Abellan van Kan G, Boonen S, Adachi J, Mitlak B, Tsouderos Y, Rolland Y, Reginster JY. Frailty and sarcopenia: definitions and outcome parameters. *Osteoporos Int* 2012; 23: 1839-48.
- Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 349-56.
- Cossarizza A, Ortolani C, Monti D, Franceschi C. Cytometric analysis of immunosenescence. *Cytometry* 1997; 27: 297-313.
- Costa-Pinto FA, Palermo-Neto J. Neuroimmune interactions in stress. *Neuroimmunomodulation* 2010; 17: 196-9.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-95.
- Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M. A higher anxiety state in old rats after social isolation is associated to an impairment of the immune response. *J Neuroimmunol* 2014a; 277: 18-25.
- Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M. The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication. *Curr Pharm Des* 2014b; 20: 4608-28.
- Cummings JL. Cognitive and behavioral heterogeneity in Alzheimer's disease: seeking the neurobiological basis. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 845-61.
- Cumurcu BE, Ozyurt H, Etikan I, Demir S, Karlidag R. Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Psychiatry Clin Neurosci* 2009; 63: 639-45.
- Dalboni TM, Abe AE, de Oliveira CE, Lara VS, Campanelli AP, Gasparoto CT, Gasparoto TH. Activation profile of CXCL8-stimulated neutrophils and aging. *Cytokine* 2013; 61: 716-9.
- Damtew B, Spagnuolo PJ, Goldsmith GG, Marino JA. Neutrophil adhesion in the elderly: inhibitory effects of plasma from elderly patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 54: 247-55.
- Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 933: 222-34.
- Dato S, Soerensen M, Lagani V, Montesanto A, Passarino G, Christensen K, Tan Q, Christiansen L. Contribution of genetic polymorphisms on functional status at very old age: a gene-based analysis of 38 genes (311 SNPs) in the oxidative stress pathway. *Exp Gerontol* 2014; 52: 23-9.

- Davidson AJ, Yamazaki S, Arble DM, Menaker M, Block GD. Resetting of central and peripheral circadian oscillators in aged rats. *Neurobiol Aging* 2008; 29: 471–7.
- Davis JB, McMurray HF, Schubert D. The amyloid beta-protein of Alzheimer's disease is chemotactic for mononuclear phagocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182: 1096-100.
- Davydova TV, Fomina VG, Voskresenskaya NI, Doronina OA. Phagocytic activity and state of bactericidal systems in polymorphonuclear leukocytes from patients with Alzheimer's disease. *Bull Exp Biol Med* 2003; 136: 355-7.
- Dayan M, Segal R, Globerson A, Habut B, Shearer GM, Mozes E. Effect of aging on cytokine production in normal and experimental systemic lupus erythematosus-afflicted mice. *Exp Gerontol* 2000; 35: 225-36.
- Daynes RA, Enioutina EY, Jones DC. Role of redox imbalance in the molecular mechanisms responsible for immunosenescence. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5: 537-48.
- De Gonzalo-Calvo D, Fernández-García B, de Luxán-Delgado B, Rodríguez-González S, García-Macia M, Suárez FM, Solano JJ, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. Long-term training induces a healthy inflammatory and endocrine emergent biomarker profile in elderly men. *Age (Dordr)* 2012; 34: 761-71.
- De Gonzalo-Calvo D, Neitzert K, Fernández M, Vega-Naredo I, Caballero B, García-Macia M, Suárez FM, Rodríguez-Colunga MJ, Solano JJ, Coto-Montes A. Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 733-7.
- De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, Pirenne J, Gathy R, Lopez M, Dehart L, Igot D, Baudrihay M, Delacroix D, Franchimont P. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 1992; 4: 239-48.
- De la Fuente M. Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1985; 81: 935-8.
- De la Fuente M. Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 213-23.
- De la Fuente M. The immune system, a marker and modulator of the rate of aging. En: Massoud A, Rezaei N, Eds. *Immunology of Aging*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2014; pp. 3-23.
- De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, F-Tresguerres JA. Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology* 2004a; 5: 389-400.
- De la Fuente M, Carrasco M, Del Rio M, Hernanz A. Modulation of murine lymphocyte functions by sulfated cholecystokinin octapeptide. *Neuropeptides* 1998; 32: 225-33.

- De la Fuente M, Carrasco M, Hernanz A. Modulation of human neutrophil function in vitro by gastrin. *J Endocrinol* 1997; 153: 475-83.
- De la Fuente M, Cruces J, Hernandez O, Ortega E. Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 3966-93.
- De la Fuente M, Del Río M, Medina S. Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol* 2001; 116: 156-67.
- De la Fuente M, Díaz B. Melatonin, aging and health. En: Montilla P, Tunez I, Eds. *Melatonin: present and future*. New York: Nova Science Publishers, Inc. 2007; pp. 143-74.
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Alvarez P, Alvarado C. Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2004b; 50: OL683-90.
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F. Vitamin E ingestión improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res* 2008; 42: 272-80.
- De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo C. The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antiox Redox Signal* 2005; 7: 1356-66.
- De la Fuente M, Medina S, Del Rio M, Ferrández MD, Hernanz A. Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. *Life Sci* 2000; 67: 2125-35.
- De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 3003-26.
- De la Fuente M, Miquel J, Catalán MP, Víctor VM, Guayerbas N. The amount of thiolic antioxidant ingestión hended to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Radic Res* 2002; 36: 119-26.
- De la Fuente M, Victor VM. Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 2000; 78: 49-54.
- De la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol* 2008; 2: 1101-13.
- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflamm-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett* 2005; 579: 2035-9.
- Dekhuijzen PN. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004; 23: 629-36.
- DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 1990; 27: 457-64.

- Del Río M, Hernanz A, De la Fuente M. Bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C. *Peptides* 1994; 15: 15-22.
- DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, Mocchegiani E, Tarazona R, Solana R. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology* 2006; 7: 471-81.
- Demas GE, Nelson RJ. Photoperiod and temperature interact to affect immune parameters in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Biol Rhythms* 1996; 11: 94-102.
- Demas GE, Nelson RJ. Exogenous melatonin enhances cell-mediated, but not humoral, immune function in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Biol Rhythms* 1998a; 13: 245-52.
- Demas GE, Nelson RJ. Photoperiod, ambient temperature, and food availability interact to affect reproductive and immune function in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Biol Rhythms* 1998b; 13: 253-62.
- Demas GE, Nelson RJ. Short-day enhancement of immune function is independent of steroid hormones in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Comp Physiol B* 1998c; 168: 419-26.
- Demir B, Caglar IM, Ugurlucan M, Ozde C, Tureli HO, Cifci S, Vural A, Karakaya O. The relationship between severity of calcific aortic stenosis and serum uric acid levels. *Angiology* 2012; 63: 603-8.
- Dennison U, McKernan DP, Scully P, Clarke G, Cryan J, Dinan T. Menstrual cycle influences Toll-like receptor responses. *Neuroimmunomodulation* 2012; 19: 171-9.
- Derhovanessian E, Larbi A, Pawelec G. Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 440-5.
- Deshpande R, Khalili H, Pergolizzi RG, Michael SD, Chang MD. Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NF- $\kappa$ B activation in murine macrophages. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 46–54.
- Di Carlo M. Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. *Eur Biophys J* 2010; 39: 877–88.
- Di Lorenzo G, Balistreri CR, Candore G, Cigna D, Colombo A, Romano GC, Colucci AT, Gervasi F, Listì F, Potestio M, Caruso C. Granulocyte and natural killer activity in the elderly. *Mech Ageing Dev* 1999; 108: 25-38.
- Dickstein JB, Moldofsky H. Sleep, cytokines and immune function. *Sleep Med Rev* 1999; 3: 219-28.
- Dijk DJ, Duffy JF, Riel E, Shanahan TL, Czeisler CA. Ageing and the circadian and homeostatic regulation of human sleep during forced desynchrony of rest, melatonin and temperature rhythms. *J Physiol* 1999; 516: 611–27.

- Dilger RN, Johnson RW. Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 932-9.
- Dimitrov S, Benedict C, Heutling D, Westermann J, Born J, Lange T. Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood* 2009; 113: 5134-43.
- Dobrowolska A, Gromadzka-Ostrowska J. Age and androgen-related changes in morphological parameters, haematological indices and serum protein fraction in common vole (*Microtus arvalis* Pall.) growing in different photoperiods. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1984; 79: 241-9.
- Doherty DE, Haslett C, Tonnesen MG, Henson PM. Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium. *J Immunol* 1987; 138: 1762-71.
- Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez MJ, Samimi-Fard S, Kaski JC, Reiter RJ. Light/dark patterns of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in relation to melatonin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Pineal Res* 2008; 44: 65-9.
- Dourado VZ, Tanni SE, Vale SA, Faganello MM, Sanchez FF, Godoy I. Systemic manifestations in chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumol* 2006; 32: 161-71.
- Dringenberg HC. Alzheimer's disease: more than a 'cholinergic disorder' — evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav Brain Res* 2000; 115: 235-49.
- Dröge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmünder H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J* 1994; 8: 1131-8.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. Increased amyloid-beta<sub>42</sub>(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 1996; 383: 710-3.
- Eismann EA, Lush E, Sephton SE. Circadian effects in cancer-relevant psychoneuroendocrine and immune pathways. *Psychoneuroendocrinology* 2010; 35: 963-76.
- Ekim M, Sekeroglu MR, Balahoroglu R, Ozkol H, Ekim H. Roles of the oxidative stress and ADMA in the development of deep venous thrombosis. *Biochem Res Int* 2014; 2014: 703128.
- Ensrud KE, Ewing SK, Cawthon PM, Fink HA, Taylor BC, Cauley JA, Dam TT, Marshall LM, Orwoll ES, Cummings SR; Osteoporotic Fractures in Men Research Group. A comparison of frailty indexes for the prediction of falls, disability, fractures, and mortality in older men. *J Am Geriatr Soc* 2009; 57: 492-8.

- Ensrud KE, Ewing SK, Fredman L, Hochberg MC, Cauley JA, Hillier TA, Cummings SR, Yaffe K, Cawthon PM; Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels and frailty status in older women. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 5266-73.
- Eren E, Ellidag HY, Cekin Y, Ayoglu RU, Sekercioglu AO, Yilmaz N. Heartvalve disease: the role of calcidiol deficiency, elevated parathyroid hormone levels and oxidative stress in mitral and aortic valve insufficiency. *Redox Rep* 2014; 19: 34-9.
- Erlandsson MC, Ohlsson C, Gustafsson JA, Carlsten H. Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus. *Immunology* 2001; 103:17-25.
- Ertzian P, Linnemann K, Schlaak M, Zabel P. Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1080-6.
- Eskes T, Haanen C. Why do women live longer than men?. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 133: 126-33.
- Eskola J, Frey H, Molnar G, Soppi E. Biological rhythm of cell-mediated immunity in man. *Clin Exp Immunol* 1976; 26: 253-7.
- España J, Giménez-Llort L, Valero J, Miñano A, Rábano A, Rodriguez-Alvarez J, LaFerla FM, Saura CA. Intraneuronal beta-amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biol Psychiatry* 2010; 67: 513–21.
- Esquifino AI, Cano P, Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos P, Cardinali DP. Neuroendocrine-immune correlates of circadian physiology: studies in experimental models of arthritis, ethanol feeding, aging, social isolation, and calorie restriction. *Endocrine* 2007; 32: 1-19.
- Fabris N. A neuroendocrine-immune theory of aging. *Int J Neurosci* 1990; 51: 373-5.
- Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, Monti D, Franceschi C, Paganelli R. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2375-8.
- Fairclough L, Urbanowicz RA, Corne J, Lamb JR. Killer cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114: 533-41.
- Farajnia S, Michel S, Deboer T, vanderLeest HT, Houben T, Rohling JH, Ramkisoensing A, Yasenkov R, Meijer JH. Evidence for neuronal desynchrony in the aged suprachiasmatic nucleus clock. *J Neurosci* 2012; 32: 5891-9.
- Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and non-survivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995; 50: B378-82.
- Ferrández MD, Correa R, Del Rio M, De la Fuente M. Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 1999; 34: 675-85.



- Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, Guralnik JM, Longo DL. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood* 2005; 105: 2294-9.
- Fiala M, Cribbs DH, Rosenthal M, Bernard G. Phagocytosis of amyloid-beta and inflammation: two faces of innate immunity in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2007; 11: 457-63.
- Fiala M, Zhang L, Gan X, Sherry B, Taub D, Graves MC, Hama S, Way D, Weinand M, Witte M, Lorton D, Kuo YM, Roher AE. Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood-brain barrier model. *Mol Med* 1998; 4: 480-9.
- Fiserová A, Starec M, Kuldová M, Kovárů H, Páv M, Vannucci L, Pospíšil M. Effects of D2-dopamine and alpha-adrenoceptor antagonists in stress induced changes on immune responsiveness of mice. *J Neuroimmunol* 2002; 130: 55-65.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-98.
- Fontan G, Llorente F, García Rodríguez MC, Ojeda JA. Defective neutrophil chemotaxis and hyperimmunoglobulinemia E. *Acta Pediatr Scand* 1976; 65: 509-13.
- Forsey RJ, Thompson JM, Ernerudh J, Hurst TL, Strindhall J, Johansson B, Nilsson BO, Wikby A. Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech Ageing Dev* 2003; 124: 487-93.
- Foschino Barbaro MP, Carpagnano GE, Spanevello A, Cagnazzo MG, Barnes PJ. Inflammation, oxidative stress and systemic effects in mild chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007; 20: 753-63.
- Foster RG, Roenneberg T. Human responses to the geophysical daily, annual and lunar cycles. *Curr Biol* 2008; 18: R784-R794.
- Franceschi C. Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured?. *Nutr Rev* 2007; 65: S173-6.
- Franceschi C, Bonafè M. Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 457-61.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 2000a; 18: 1717-20.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000b; 908: 244-54.
- Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 2007; 128: 92-105.

- Franceschi C, Monti D, Barbieri D, Salvioli S, Grassilli E, Capri M, Troiano L, Guido M, Bonafè M, Tropea F, Salomoni P, Benatti F, Bellesia E, Macchioni S, Anderlini R, Sansoni P, Mariotti S, Wratten ML, Tetta C, Cossarizza A. Successful immunosenescence and the remodelling of immune responses with ageing. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 18-25.
- Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today* 1995; 16: 12-6.
- Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 6377-81.
- Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, Seeman T, Tracy R, Kop WJ, Burke G, McBurnie MA; Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 56: M146-56.
- Frisardi V, Solfrizzi V, Seripa D, Capurso C, Santamato A, Sancarlo D, Vendemiale G, Pilotto A, Panza F. Metabolic-cognitive syndrome: a cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 2010; 9: 399-417.
- Froy O. Circadian rhythms, aging, and life span in mammals. *Physiology (Bethesda)* 2011; 26: 225–35.
- Froy O, Chapnik N. Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine. *Mol Immunol* 2007; 44: 1954-60.
- Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guérard KP, Lesur O, Khalil A, Dupuis G. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* 2004; 3: 217–26.
- Furukawa T, Inoue M, Kajiya F, Inada H, Takasugi S, Fukui S, Takeda H, Abe H. Assessment of biological age by multiple regression analysis. *J Gerontol* 1975; 30: 422-34.
- Gabriel P, Cakman I, Rink L. Overproduction of monokines by leukocytes after stimulation with lipopolysaccharide in the elderly. *Exp Gerontol* 2002; 37: 235-47.
- Gachon F, Nagoshi E, Brown SA, Ripperger J, Schibler U. The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma* 2004; 113: 103-12.
- Gaillard RC, Spinedi E. Sex- and stress-steroids interactions and the immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Domest Anim Endocrinol* 1998; 15: 345-52.
- Galioto A, Dominguez LJ, Pineo A, Ferlisi A, Putignano E, Belvedere M, Costanza G, Barbagallo M. Cardiovascular risk factors in centenarians. *Exp Gerontol* 2008; 43: 106-13.
- Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995; 3: 459-73.
- Gameiro CM, Romão F, Castelo-Branco C. Menopause and aging: changes in the immune system—a review. *Maturitas* 2010; 67: 316–20.

- Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59: 574-80.
- García-García FJ, Larrión Zugasti JL, Rodríguez Mañas L. Frailty: a phenotype under review. *Gac Sanit* 2011; 25: 51-8.
- Gardner EM, Murasko DM. Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans. *Biogerontology* 2002; 3: 271-89.
- Gatti G, Del Ponte D, Cavallo R, Sartori ML, Salvadori A, Carignola R, Carandente F, Angeli A. Circadian changes in human natural killer-cell activity. *Prog Clin Biol Res* 1987; 227A: 399-409.
- Gencer M, Aksoy N, Dagli EC, Uzer E, Aksoy S, Selek S, Celik H, Cakir H. Prolidase activity dysregulation and its correlation with oxidative-antioxidative status in chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Lab Anal* 2011; 25: 8-13.
- Gerli R, Monti D, Bistoni O, Mazzone AM, Peri G, Cossarizza A, Di Gioacchino M, Cesarotti ME, Doni A, Mantovani A, Franceschi C, Paganelli R. Chemokines, sTNF-Rs and sCD30 serum levels in healthy aged people and centenarians. *Mech Ageing Dev* 2000; 121: 37-46.
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1106-14.
- Ghosh D, LeVault KR, Barnett AJ, Brewer GJ. A reversible early oxidized redox state that precedes macromolecular ROS damage in aging nontransgenic and 3xTg-AD mouse neurons. *J Neurosci* 2012; 32: 5821-32.
- Gibson EM, Williams WP 3rd, Kriegsfeld LJ. Aging in the circadian system: considerations for health, disease prevention and longevity. *Exp Gerontol* 2009; 44: 51-6.
- Gibson GE, Huang HM. Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease. *Front Biosci* 2002; 7: d1007-15.
- Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, Grune T. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res* 2006; 40: 495-505.
- Gillette Guyonnet GS, Abellan Van Kan G, Alix E, Andrieu S, Belmin J, Berrut G, Bonnefoy M, Brocker P, Constans T, Ferry M, Ghisolfi-Marque A, Girard L, Gonthier R, Guerin O, Hervy MP, Jouanny P, Laurain MC, Lechowski L, Nourhashemi F, Raynaud-Simon A, Ritz P, Roche J, Rolland Y, Salva T, Vellas B; International Academy on Nutrition and Aging Expert Group. IANA (International Academy on Nutrition and Aging) Expert Group: weight loss and Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging* 2007; 11: 38 – 48.

- Gillis S, Kozak R, Durante M, Weksler ME. Immunological studies of aging. Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans. *J Clin Invest* 1981; 67: 937-42.
- Giménez-Llort L, Arranz L, Maté I, De la Fuente M. Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTgAD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 331-43.
- Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Johansson B, Oddo S, Tobeña A, LaFerla FM, Frenández-Teruel A. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; 31: 125-47.
- Giménez-Llort L, Maté I, Manassra R, Vida C, De la Fuente M. Peripheral immune system and neuroimmune communication impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1262: 74-84.
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quaglino D. The immune system in the elderly: III. Innate immunity. *Immunol Res* 1999; 20: 117-26.
- Ginn-Pease ME, Whisler RL. Redox signals and NF- $\kappa$ B activation in T cells. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 346-61.
- Girasole G, Giuliani N, Modena AB, Passeri G, Pedrazzoni M. Oestrogens prevent the increase of human serum soluble interleukin-6 receptor induced by ovariectomy in vivo and decrease its release in human osteoblastic cells in vitro. *Clin Endocrinol* 1990; 51: 801-7.
- Giuliani N, Sansoni P, Girasole G, Vescovini R, Passeri G, Passeri M, Pedrazzoni M. Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and soluble gp130 exhibit different patterns of age- and menopause-related changes. *Exp Gerontol* 2001; 36: 547-57.
- Giunta B, Fernandez F, Nikolic WV, Obregon D, Rrapo E, Town T, Tan J. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 51.
- Globerson A, Effros RB. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today* 2000; 21: 515-21.
- Godbout JP, Moreau M, Lestage J, Chen J, Sparkman NL, O' Connor J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R, Johnson RW. Aging exacerbates depressive-like behaviour in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 2341-51.
- Goetzl EJ, Huang MC, Kon J, Patel K, Schwartz JB, Fast K, Ferrucci L, Madara K, Taub DD, Longo DL. Gender specificity of altered human immune cytokine profiles in aging. *FASEB J* 2010; 24: 3580-9.
- Goldeck D, Larbi A, Pellicanó M, Alam I, Zerr I, Schmidt C, Fulop T, Pawelec G. Enhanced chemokine receptor expression on leukocytes of patients with Alzheimer's disease. *PLoS One* 2013; 8: e66664.

- Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 2010; 90: 1063-102.
- Gon Y, Hashimoto S, Hayashi S, Koura T, Matsumoto K, Horie T. Lower serum concentrations of cytokines in elderly patients with pneumonia and the impaired production of cytokines by peripheral blood monocytes in the elderly. *Clin Exp Immunol* 1996; 106: 120-6.
- Gonullu H, Aslan M, Karadas S, Kati C, Duran L, Milanlioglu A, Aydin MN, Demir H. Serum prolidase enzyme activity and oxidative stress levels in patients with acute hemorrhagic stroke. *Scand J Clin Lab Invest* 2014; 74: 199-205.
- González J, Valls N, Brito R, Rodrigo R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J Cardiol* 2014; 6: 353-66.
- Goronzy JJ, Lee WW, Weyand CM. Aging and T-cell diversity. *Exp Gerontol* 2007; 42: 400-6.
- Gouras GK, Almeida CG, Takahashi RH. Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 1235-44.
- Goyns MH. Genes, telomeres and mammalian ageing. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 791-9.
- Granger DN, Stokes KY, Shigematsu T, Cerwinka WH, Tailor A, Kriegstein CF. Splanchnic ischaemia-reperfusion injury: mechanistic insights provided by mutant mice. *Acta Physiol Scand* 2001; 173: 83-91.
- Gruzdeva O, Uchasova E, Dyleva Y, Belik E, Karetnikova V, Shilov A, Barbarash O. Multivessel coronary artery disease, free fatty acids, oxidized LDL and its antibody in myocardial infarction. *Lipids Health Dis* 2014; 13: 111.
- Guayerbas N, Catalan M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* 2002a; 134: 41-8.
- Guayerbas N, De la Fuente M. An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol* 2003; 27: 339-50.
- Guayerbas N, Puerto M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002b; 37: 249-56.
- Gupta S, Gollapudi S. Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in aging human T cell subsets. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1034-42.
- Haack M, Hinze-Selch D, Fenzel T, Kraus T, Kühn M, Schuld A, Pollmächer T. Plasma levels of cytokines and soluble cytokine receptors in psychiatric patients upon hospital admission: effects of confounding factors and diagnosis. *J Psychiatr Res* 1999; 33: 407-18.
- Hajishengallis G. Too Old to Fight? Aging and its Toll on Innate Immunity. *Mol Oral Microbiol* 2010; 25: 25-37.

- Halagappa VK, Guo Z, Pearson M, Matsuoka Y, Cutler RG, Laferla FM, Mattson MP. Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2007; 26: 212-20.
- Halberg F. Chronobiology. *Ann Rev Physiol* 1969; 31: 675-725.
- Halici B, Sarinc Ulasli S, Günay E, Nural S, Sen S, Akar O, Celik S, Unlu M. Assessment of inflammatory biomarkers and oxidative stress in pulmonary thromboembolism: follow-up results. *Inflammation* 2014; 37: 1186-90.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblast. *Nature* 1990; 345: 458-60.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
- Harman D. The biological clock. The mitochondria?. *J Am Geriatr Soc* 1972; 20: 99-117.
- Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 774-97.
- Harrison R. Physiological roles of xanthine oxidor- reductase. *Drug Metab Rev* 2004; 36: 363–75.
- Hart BL. Biological basis of the behaviour of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* 1988; 12: 123-37.
- Hasler P, Zouali M. Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cell Immunol* 2005; 233: 102-8.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 2002; 295:1065–70.
- Haus E. Chronobiology in the endocrine system. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 985-1014.
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36.
- Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problema. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1100: 1-13.
- He B, Zhao M, Qi G. [Activation of transcription factors and induction of cytokines from macrophages in chronic obstructive pulmonary disease]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2001; 81: 1360-4.
- He B, Zhao MW, Wang YZ, Liu XF, Yao WZ. [The study of inflammatory mediators and pulmonary ventilatory capacity in patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2003; 26: 22-5.

- He Z, Chen Y, Chen P, Wu G, Cai S. Local inflammation occurs before systemic inflammation in patients with COPD. *Respirology* 2010; 15: 478-84.
- Heaney JL, Phillips AC, Carroll D. Aging, health behaviors, and the diurnal rhythm and awakening response of salivary cortisol. *Exp Aging Res* 2012; 38: 295-314.
- Hedley DW, Currie GA. Monocytes and macrophages in malignant melanoma. Reduction of nitroblue tetrazolium by peripheral blood monocytes. *Br J Cancer* 1978; 37: 747-52.
- Hellewell PG, Williams TJ. The Neutrophil. *Immunopharmacology of Neutrophils*. London: Academic Press 1994.
- Hendre AS, Shariff AK, Patil SR, Durgawale PP, Sontakke AV, Suryakar AN. Evaluation of oxidative stress and anti-oxidant status in essential hypertension. *J Indian Med Assoc* 2013; 111: 377-8, 380-1.
- Hernanz A, Collazos ME, De la Fuente M. Effect of age, culture medium and lymphocyte presence on ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and guinea pigs during phagocytosis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 91: 166-70.
- Hernanz A, Tato E, De la Fuente M, de Miguel E, Arnalich F. Differential effects of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y, somatostatin and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by whole blood cells from healthy young and old subjects. *J Neuroimmunol* 1996; 71: 25-30.
- Herrero C, Sebastián C, Marqués L, Comalada M, Xaus J, Valledor AF, Lloberas J, Celada A. Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. *Exp Gerontol* 2002; 37: 389-94.
- Hickman SE, El Khoury J. Mechanisms of mononuclear phagocyte recruitment in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010; 9: 168-73.
- Himmerich H, Fulda S, Linseisen J, Seiler H, Wolfram G, Himmerich S, Gedrich K, Pollmächer T. TNF-alpha, soluble TNF receptor and interleukin-6 plasma levels in the general population. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17: 196-201.
- Hirokawa K. Age-related changes of signal transduction in T cells. *Exp Gerontol* 1999; 34: 7-18.
- Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M, Kurashima C. Aging and immunity. *Acta Pathol Jpn* 1992; 42: 537-48.
- Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74: 214-26.
- Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S. Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clin Exp Immunol* 2007; 150: 22-9.

- Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, Scicchitano R, Holmes M. Increased production of TGF-beta and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L492-9.
- Hofman MA, Swaab DF. Living by the clock: the circadian pacemaker in older people. *Ageing Res Rev* 2006; 5: 33–51.
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 1998; 4: 97-100.
- Hölscher C. Possible causes of Alzheimer's disease: amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis. *Neurobiol Dis* 1998; 5: 129-41.
- Howard M, O'Garra A. Biological properties of IL-10. *Immunol Today* 1992; 13: 198–200.
- Hsiao KK, Borchelt DR, Olson K, Johannsdottir R, Kitt C, Yunis W, Xu S, Eckman C, Younkin S, Price D, *et al.* Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron* 1995; 15: 1203-18.
- Hu GR, Walls RS, Creasey H, McCusker E, Broe GA. Peripheral blood lymphocyte subset distribution and function in patients with Alzheimer's disease and other dementias. *Aust N Z J Med* 1995; 25: 212-7.
- Huang MC, Greig NH, Luo W, Tweedie D, Schwartz JB, Longo DL, Ferrucci L, Ershler WB, Goetzl EJ. Preferential enhancement of older human T cell cytokine generation, chemotaxis, proliferation and survival by lenalidomide. *Clin Immunol* 2011; 138: 201-11.
- Hubbard RE, Woodhouse KW. Frailty, inflammation and the elderly. *Biogerontology* 2010; 11: 635-41.
- Hugli TE. Chemotaxis. *Curr Opin Immunol* 1989; 2: 19–27.
- Huppert FA, Solomou W, O'Connor S, Morgan K, Sussams P, Brayne C. Aging and lymphocyte subpopulations: whole-blood analysis of immune markers in a large population sample of healthy elderly individuals. *Exp Gerontol* 1998; 33: 593-600.
- Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 1992; 257: 1496-502.
- Hyde Z, Flicker L, Almeida OP, Hankey GJ, McCaul KA, Chubb SA, Yeap BB. Low free testosterone predicts frailty in older men: the health in men study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 3165-72.
- Ihara Y, Morishima-Kawashima M, Nixon R. The ubiquitin-proteasome system and the autophagic-lysosomal system in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2.



- Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* 2001; 305: 75-80.
- Inglés M, Gambini J, Carnicero JA, García-García FJ, Rodríguez-Mañas L, Olaso-González G, Dromant M, Borrás C, Viña J. Oxidative stress is related to frailty, not to age or sex, in a geriatric population: lipid and protein oxidation as biomarkers of frailty. *J Am Geriatr Soc* 2014; 62: 1324-8.
- Inkeles B, Judith B, Kuntz MM, Kadish AS, Weksler ME. Immunologic studies of aging. III. Cytokinetic basis for the impaired response of lymphocytes from aged humans to plant lectins. *J Exp Med* 1977; 145: 1176.
- Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1739: 198–210.
- Irwin M, Brown M, Patterson T, Hauger R, Mascovich A, Grant I. Neuropeptide Y and natural killer cell activity: findings in depression and Alzheimer caregiver stress. *FASEB J* 1991; 5: 3100-7.
- Jana A, Pahan K. Fibrillar amyloid- $\beta$  peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 51451-9.
- Janeway CA, Goldstein P. Lymphocyte activation and effector functions. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 283–6.
- Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 2004; 53: 474-81.
- Janus C, Westaway D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiol Behav* 2001; 73: 873– 86.
- Jean DC, Baas PW. It cuts two ways: microtubule loss during Alzheimer disease. *EMBO J* 2013; 32: 2900-2.
- Jo DG, Arumugama TV, Woo HN, Park JS, Tang SC, Mughal M, Hyun DH, Park JH, Choi YH, Gwon AR, Camandola S, Cheng A, Cai H, Song W, Markesbery WR, Mattson MP. Evidence that gamma-secretase mediates oxidative stress-induced beta-secretase expression in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2010; 31: 917–25.
- Johnson RW. The concept of sickness behaviour: a brief chronological account of four key discoveries. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87: 443-50.
- Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients* 2012; 4: 1399-440.
- Jones DP, Mody VC Jr, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P Jr. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1290-300.

- Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2004; 25: 5-16.
- Kadioglu E, Sardas S, Aslan S, Isik E, Esat Karakaya A. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers* 2004; 9: 203-9.
- Kamada M, Irahara M, Maegawa M, Ohmoto Y, Takeji T, Yasui T, Aono T. Postmenopausal changes in serum cytokine levels and hormone replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 309-14.
- Kaplan JE, Chrenek RD, Morash JG, Ruksznis CM, Hannum LG. Rhythmic patterns in phagocytosis and the production of reactive oxygen species by zebrafish leukocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2008; 151: 726-30.
- Karabacak M, Dogan A, Tayyar S, Bas HA. Oxidative stress status increase in patients with nonischemic heart failure. *Med Princ Pract* 2014; 23: 532-7.
- Káradóttir R, Axelsson J. Melatonin secretion in SAD patients and healthy subjects matched with respect to age and sex. *Int J Circumpolar Health* 2001; 60: 548-51.
- Karanfilov CI, Liu B, Fox CC, Lakshmanan RR, Whisler RL. Age-related defects in Th1 and Th2 cytokine production by human T cells can be dissociated from altered frequencies of CD45RA+ and CD45RO+ T cell subsets. *Mech Ageing Dev* 1999; 109: 97-112.
- Karelson E, Bogdanovic N, Garlind A, Winblad B, Zilmer K, Kullisaar T, Vihalemm T, Kairane C, Zilmer M. The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer's disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res* 2001; 26: 353-61.
- Kasapoglu M, Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* 2001; 36: 209-20.
- Kastin AJ, Pan W, Maness LM, Banks WA. Peptides crossing the blood-brain barrier: some unusual observations. *Brain Res* 1999; 848: 96-100.
- Kaszubowska L, Kaczor JJ, Hak L, Dettlaff-Pokora A, Szarynska M, Kmiec Z. Sensitivity of natural killer cells to activation in the process of ageing is related to the oxidative and inflammatory status of the elderly. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62: 101-9.
- Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW. Studies of Illness in the Aged. The Index of Adl: A Standardized Measure of Biological and Psychosocial Function. *JAMA* 1963; 185: 914-9.
- Kawakami F, Okamura H, Tamada Y, Maebayashi Y, Fukui K, Ibata Y. Loss of day-night differences in VIP mRNA levels in the suprachiasmatic nucleus of aged rats. *Neurosci Lett* 1997; 222: 99-102.
- Kawamoto EM, Munhoz CD, Glezer I, Bahia VS, Caramelli P, Nitrini R, Gorjão R, Curi R, Scavone C, Marcourakis T. Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 857-64.

- Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 530-4.
- Kelley KW, O'Connor JC, Lawson MA, Dantzer R, Rodriguez-Zas SL, McCusker RH. Aging leads to prolonged duration of inflammation-induced depression-like behaviour caused by *Bacillus Calmette-Guérin*. *Brain Behav Immun* 2013; 32: 63-9.
- Kharrazi H, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavalani H, Aminian M, Pourmotabbed T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin Biochem* 2008; 41: 932-6.
- Kiessling S, Eichele G, Oster H. Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. *J Clin Invest* 2010; 120: 2600-9.
- Kim OY, Chae JS, Paik JK, Seo HS, Jang Y, Cavaillon JM, Lee JH. Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women. *Age (Dordr)* 2012; 34: 415-25.
- Kinoshita D, Cohn DW, Costa-Pinto FA, de Sá-Rocha LC. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. *Physiol Behav* 2009; 96: 328-32.
- Kinzenbaw DA, Chu Y, Peña Silva RA, Didion SP, Faraci FM. Interleukin-10 protects against aging-induced endothelial dysfunction. *Physiol Rep* 2013; 1: e00149.
- Kirkwood TBL. Gerontology: Healthy old age. *Nature* 2008; 455: 739-23.
- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2005; 25: 8843-53.
- Klerman EB, Rimmer DW, Dijk DJ, Kronauer RE, Rizzo JF 3rd, Czeisler CA. Nonphotic entrainment of the human circadian pacemaker. *Am J Physiol* 1998; 274: R991-6.
- Knight EM, Verkhatsky A, Luckman SM, Allan SM, Lawrence CB. Hypermetabolism in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 187-93.
- Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30: 145-58.
- Kondratova AA, Kondratov RV. The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 325-35.
- Kosenko EA, Aliev G, Tikhonova LA, Li Y, Poghosyan AC, Kaminsky YG. Antioxidant status and energy state of erythrocytes in Alzheimer dementia: probing for markers. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012; 11: 926-32.
- Kotan VO, Sarandol E, Kirhan E, Ozkaya G, Kirli S. Effects of long-term antidepressant treatment on oxidative status in major depressive disorder: a 24-week follow-up study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011; 35: 1284-90.

- Krabbe KS, Bruunsgaard H, Hansen CM, Moller K, Fonsmark L, Qvist J, Madsen PL, Kronborg G, Andersen HO, Skinhoj P, Pedersen BK. Ageing is associated with a prolonged fever response in human endotoxemia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 333-8.
- Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* 2004; 39: 687-99.
- Krause D, Mastro AM, Handte G, Smiciklas-Wright H, Miles MP, Ahluwalia N. Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well-nourished women. *Mech Ageing Dev* 1999; 112: 43-57.
- Krishnaraj R. Senescence and cytokines modulate the NK cell expression. *Mech Ageing Dev* 1997; 96: 89-101.
- Kronfol Z, Nair M, Zhang Q, Hill EE, Brown MB. Circadian immune measures in healthy volunteers: relationship to hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones and sympathetic neurotransmitters. *Psychosom Med* 1997; 59: 42-50.
- Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 641-55.
- Kulinsky VI. Biochemical aspects of inflammation. *Biochemistry (Mosc)* 2007; 72: 595-607.
- Kuo HK, Liao KC, Leveille SG, Bean JF, Yen CJ, Chen JH, Yu YH, Tai TY. Relationship of homocysteine levels to quadriceps strength, gait speed, and late-life disability in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62: 434-9.
- Kuo HK, Yen CJ, Chang CH, Kuo CK, Chen JH, Sorond F. Relation of C-reactive protein to stroke, cognitive disorders, and depression in the general population: systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2005; 4: 371-80.
- Kurashima C, Utsuyama M. Age-related changes of cytokine production by murine helper T cell subpopulations. *Pathobiology* 1997; 65: 155-62.
- Kusanagi H, Mishima K, Satoh K, Echizenya M, Katoh T, Shimizu T. Similar profiles in human period1 gene expression in peripheral mononuclear and polymorphonuclear cells. *Neurosci Lett* 2004; 365: 124-7.
- Kutza J, Murasko DM. Effects of aging on natural killer cell activity and activation by interleukin-2 and IFN-alpha. *Cell Immunol* 1994; 155: 195-204.
- Kutza J, Murasko DM. Age-associated decline in IL-2 and IL-12 induction of LAK cell activity of human PBMC samples. *Mech Ageing Dev* 1996; 90: 209-22.
- Kwon HJ, Sung BK, Kim JW, Lee JH, Kim ND, Yoo MA, Kang HS, Baek HS, Bae SJ, Choi JS, Takahashi R, Goto S, Chung HY. The effect of lipopolysaccharide on enhanced inflammatory process with age: Modulation of NF- $\kappa$ B. *J Am Aging Assoc* 2001; 24: 163-71.

- Labunets IF. Age-related changes in circadian and circannual fluctuations of the immune response and the number of cells in lymphoid organs of animals: a possible connection to thymic factors. *Fiziol Zh* 2001; 47: 54-62161.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 499-509.
- Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 79: 469–84.
- Lalmohamed A, Opdam F, Arden NK, Prieto-Alhambra D, van Staa T, Leufkens HG, de Vries F. Knee arthroplasty and risk of hip fracture: a population-based, case-control study. *Calcif Tissue Int* 2012; 90: 144-50.
- Lam RW, Song C, Yatham LN. Does neuroimmune dysfunction mediate seasonal mood changes in winter depression?. *Med Hypotheses* 2004; 63: 567-73.
- Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM, Schipper HM, Derhovanessian E, Goldeck D, Fulop T. Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 17: 91-103.
- Larson EB, Shadlen MF, Wang L, McCormick WC, Bowen JD, Teri L, Kukull WA. Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Ann Intern Med* 2004; 140: 501-9.
- Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist* 1969; 9: 179-86.
- Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, Debré P, Merle-Beral H, Vieillard V. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* 2010; 9: 527-35.
- Lee M, Cho T, Jantarantotai N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J* 2010; 24: 2533-45.
- Leffell MS, Lumsden L, Steiger WA. An analysis of T lymphocyte subpopulations in patients with Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 1985; 33: 4-8.
- Leone MJ, Marpegan L, Bekinschtein TA, Costas MA, Golombek DA. Suprachiasmatic astrocytes as an interface for immune-circadian signalling. *J Neurosci Res* 2006; 84: 1521-7.
- Leposavić G, Perisić M, Kosec D, Arsenović-Ranin N, Radojević K, Stojić-Vukanić Z, Pilipović I. Neonatal testosterone imprinting affects thymus development and leads to phenotypic rejuvenation and masculinization of the peripheral blood T-cell compartment in adult female rats. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 294-304.
- Leuner K, Pantel J, Frey C, Schindowski K, Schulz K, Wegat T, Maurer K, Eckert A, Müller WE. Enhanced apoptosis, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphocytes as potential biomarkers for Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 2007: 207-15.

- Leuner K, Schulz K, Schütt T, Pantel J, Prvulovic D, Rhein V, Savaskan E, Czech C, Eckert A, Müller WE. Peripheral mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: focus on lymphocytes. *Mol Neurobiol* 2012; 46: 194-204.
- Leutner S, Schindowski K, Frölich L, Maurer K, Kratzsch T, Eckert A, Müller WE. Enhanced ROS-generation in lymphocytes from Alzheimer's patients. *Pharmacopsychiatry* 2005; 38: 312-5.
- Lévi F, Canon C, Dipalma M, Florentin I, Misset JL. When should the immune clock be reset? From circadian pharmacodynamics to temporally optimized drug delivery. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 618: 312-29.
- Lévi FA, Canon C, Touitou Y, Reinberg A, Mathé G. Seasonal modulation of the circadian time structure of circulating T and natural killer lymphocyte subsets from healthy subjects. *J Clin Invest* 1988a; 81: 407-13.
- Lévi FA, Canon C, Touitou Y, Sulon J, Mechkouri M, Ponsart ED, Touboul JP, Vannetzel JM, Mowzowicz I, Reinberg A, *et al.* Circadian rhythms in circulating T lymphocyte subtypes and plasma testosterone, total and free cortisol in five healthy men. *Clin Exp Immunol* 1988b; 71: 329-35.
- Levy SM, Herberman RB, Lee J, Whiteside T, Beadle M, Heiden L, Simons A. Persistently low natural killer cell activity, age, and environmental stress as predictors of infectious morbidity. *Natl Immunol Cell Growth Regul* 1991; 10: 289-307.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 2001; 293: 1487-91.
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Murphy MP, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 2000; 25: 402-5.
- Li H, Manwani B, Leng SX. Frailty, inflammation, and immunity. *Aging Dis* 2011; 2: 466-73.
- Li M, Walter R, Torres C, Sierra F. Impaired signal transduction in mitogen activated rat splenic lymphocytes during aging. *Mech Ageing Dev* 2000; 113: 85-99.
- Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, Müller-Hermelink HK, Steinmann GG. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev* 1984; 28: 47-55.
- Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 2004; 5: 133-9.

- Lio D, D'Anna C, Gervasi F, Scola L, Potestio M, Di Lorenzo G, Listì F, Colombo A, Candore G, Caruso C. Interleukin-12 release by mitogen-stimulated mononuclear cells in the elderly. *Mech Ageing Dev* 1998; 102: 211-9.
- Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafè M, Cavallone L, Franceschi C, Caruso C. Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immun* 2002; 3: 30-3.
- Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafè M, Cavallone L, Marchegiani F, Olivieri F, Franceschi C, Caruso C. Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10 -1082 promoter SNP and its interaction with TNF-alpha -308 promoter SNP. *J Med Genet* 2003; 40: 296-9.
- Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Brivio O, Fumagalli L. Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Nat Immun* 1998; 16: 1-5.
- Liu H, Liu K, Bodenner DL. Estrogen receptor inhibits interleukin-6 gene expression by disruption of nuclear factor- $\kappa$ B transactivation. *Cytokine* 2005; 31: 251-7.
- Liu LY, Zeng M, Xie CM, Gao JH, Yan YS, Lu GF, Wang H, He YP. [Oxidative stress status in patients with chronic obstructive pulmonary disease and its relation to glucocorticoid receptor levels]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2008; 28: 992-6.
- Lombardi VR, García M, Rey L, Cacabelos R. Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals. *J Neuroimmunol* 1999; 97: 163-71.
- Lord JM, Butcher S, Killampali V, Lascelles D, Salmon M. Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1521-35.
- Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Hum Genet* 2004; 5: 407-41.
- Luca M, Chavez-Ross A, Edelstein-Keshet L, Mogilner A. Chemotactic signaling, microglia, and Alzheimer's disease senile plaques: is there a connection?. *Bull Math Biol* 2003; 65: 693-730.
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006; 147: S232-40.
- Lucas-Sánchez A, Martínez-Nicolas A, Escames G, de Costa J. Aging of the circadian system. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2012; 47: 76-80.
- Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* 2009; 30: 366-73.
- Ma YX, Yue Z, Wang ZS, Chen SQ, Liang ZJ, Zhang JG, Qi G, Lin H. Physiological basis for long life span. *Mech Ageing Dev* 1997; 98: 47-55.

- Mackay CR, Imhof BA. Cell adhesion in the immune system. *Immunol Today* 1993; 14: 99-102.
- MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* 2000; 117: 303S-17S.
- MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease?. *Trends Mol Med* 2001; 7: 55-62.
- Madeddu C, Gramignano G, Floris C, Murenu G, Sollai G, Macciò A. Role of inflammation and oxidative stress in post-menopausal oestrogen-dependent breast cancer. *J Cell Mol Med* 2014; 18: 2519-29.
- Maes M, DeVos N, Wauters A, Demedts P, Maurits VW, Neels H, Bosmans E, Altamura C, Lin A, Song C, Vandenbroucke M, Scharpe S. Inflammatory markers in younger vs elderly normal volunteers and in patients with Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* 1999; 33: 397-405.
- Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011; 35: 676-92.
- Maestrelli P, Saetta M, Mapp CE, Fabbri LM. Remodeling in response to infection and injury. Airway inflammation and hypersecretion of mucus in smoking subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: S76-80.
- Maggio M, Basaria S, Ble A, Lauretani F, Bandinelli S, Ceda GP, Valenti G, Ling SM, Ferrucci L. Correlation between testosterone and the inflammatory marker soluble interleukin-6 receptor in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 345-7.
- Mahmoud I, Salman SS, al-Khateeb A. Continuous darkness and continuous light induce structural changes in the rat thymus. *J Anat* 1994; 185: 143-9.
- Malavolta M, Basso A, Piacenza F, Costarelli L, Giacconi R, Mocchegiani E. Peripheral mononuclear cell rejuvenation for senescence surveillance in Alzheimer disease. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 1720-6.
- Mamelak M. Sporadic Alzheimer's disease: the starving brain. *J Alzheimers Dis* 2012; 31: 459-74.
- Manassra R, Maté I, Cruces J, Rol MA, De la Fuente M. Circadian changes in several functions of peritoneal immune cells from adult and old mice. *Neuroimmunomodulation* 2011; 18: 390.
- Mandal PK, Tripathi M, Sugunan S. Brain oxidative stress: Detection and mapping of anti-oxidant marker 'Glutathione' in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 417: 43-8.



- Mann CJ. Observational research methods. Research design II: cohort, cross sectional, and case-control studies. *Emerg Med J* 2003; 20: 54-60.
- Mann DR, Akinbami MA, Gould KG, Ansari AA. Seasonal variations in cytokine expression and cell-mediated immunity in male rhesus monkeys. *Cell Immunol* 2000a; 200: 105-15.
- Mann DR, Akinbami MA, Lunn SF, Fraser HM, Gould KG, Ansari AA. Endocrine- immune interaction: alterations in immune function resulting from neonatal treatment with a GnRH antagonist and seasonality in male primates. *Am J Reprod Immunol* 2000b; 44: 30-40.
- Maple C, Kirk G, McLaren M, Veale D, Belch JJ. A circadian variation exists for soluble levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in healthy volunteers. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94: 537-40.
- Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA, Freedman ML. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1998; 150: 40-4.
- Mariani E, Cattini L, Neri S, Malavolta M, Mocchegiani E, Ravaglia G, Facchini A. Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: relationship with zinc status. *Biogerontology* 2006; 7: 449-59.
- Mariani E, Mariani AR, Meneghetti A, Tarozzi A, Cocco L, Facchini A. Age-dependent decreases of NK cell phosphoinositide turnover during spontaneous but not Fc-mediated cytolytic activity. *Int Immunol* 1998; 10: 981-9.
- Mariani E, Meneghetti A, Neri S, Ravaglia G, Forti P, Cattini L, Facchini A. Chemokine production by natural killer cells from nonagenarians. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1524-9.
- Mariani E, Neri S, Cattini L, Mocchegiani E, Malavolta M, Dedoussis GV, Kanoni S, Rink L, Jajte J, Facchini A. Effect of zinc supplementation on plasma IL-6 and MCP-1 production and NK cell function in healthy elderly: interactive influence of +647 MT1a and -174 IL-6 polymorphic alleles. *Exp Gerontol* 2008; 43: 462-71.
- Mariani E, Pulsatelli L, Meneghetti A, Dolzani P, Mazzetti I, Neri S, Ravaglia G, Forti P, Facchini A. Different IL-8 production by T and NK lymphocytes in elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1383-95.
- Mariani E, Sgobbi S, Meneghetti A, Tadolini M, Tarozzi A, Sinoppi M, Cattini L, Facchini A. Perforins in human cytolytic cells: the effect of age. *Mech Ageing Dev* 1996; 92: 195-209.
- Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 134-47.
- Marpegán L, Bekinschtein TA, Costas MA, Golombek DA. Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *J Neuroimmunol* 2005; 160: 102-9.

- Martin B, Brenneman R, Becker KG, Gucek M, Cole RN, Maudsley S. iTRAQ analysis of complex proteome alterations in 3xTgAD Alzheimer's mice: understanding the interface between physiology and disease. *PLoS One* 2008; 3: e2750.
- Martins LC, Rocha NP, Torres KC, Dos Santos RR, França GS, de Moraes EN, Mukhamedyarov MA, Zefirov AL, Rizvanov AA, Kiyasov AP, Vieira LB, Guimarães MM, Yalvaç ME, Teixeira AL, Bicalho MA, Janka Z, Romano-Silva MA, Palotás A, Reis HJ. Disease-specific expression of the serotonin-receptor 5-HT(2C) in natural killer cells in Alzheimer's dementia. *J Neuroimmunol* 2012; 251: 73-9.
- Marx F, Blasko I, Pavelka M, Grubeck-Loebenstein B. The possible role of the immune system in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 1998; 33: 871-81.
- Mate I, Cruces J, Vida C, Sanfeliu C, Manassra R, Giménez-Llort L, De la Fuente M. Premature immunosenescence in triple-transgenic mice for Alzheimer's disease. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2014a; 49: 15-9.
- Mate I, Madrid JA, De la Fuente M. Chronobiology of the neuroimmunoendocrine system and aging. *Curr Pharm Des* 2014b; 20: 4642-55.
- Maté I, Manassra R, Carpintero C, Madrid JA, De la Fuente M. Cambios al envejecer en el ritmo circadiano de las funciones de los fagocitos de ratones y de humanos. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2010; 45: 139.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
- Matheson M, Rynell AC, McClean M, Berend N. Cigarette smoking increases neutrophil formyl methionyl leucyl phenylalanine receptor numbers. *Chest* 2003; 123: 1642-6.
- Matsuoka Y, Picciano M, Malester B, LaFrancois J, Zehr C, Daeschner JM, Olschowka JA, Fonseca MI, O'Banion MK, Tenner AJ, Lemere CA, Duff K. Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2001; 158: 1345-54.
- Mattson MP. Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurovirol* 2002; 8: 539-50.
- Maugeri D, Santangelo A, Bonanno MR, Testai M, Abbate S, Lo Giudice F, Mamazza C, Puglisi N, Panebianco P. Oxidative stress and aging: studies on an East-Sicilian, ultraoctagenarian population living in institutes or at home. *Arch Gerontol Geriatr Suppl* 2004: 271-7.
- Mazzocchi G, Balzanelli M, Giuliani A, De Cata A, La Viola M, Carella AM, Bianco G, Tarquini R. Lymphocyte subpopulations anomalies in lung cancer patients and relationship to the stage of the disease. *In Vivo* 1999; 13: 205-9.
- McArthur WP. Effect of aging on immunocompetent and inflammatory cells. *Periodontol* 2000 1998; 16: 53-79.

- McCrea KA, Ensor JE, Nall K, Bleecker ER, Hasday JD. Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 696-703.
- McGeer EG, McGeer PL. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27: 741-9.
- McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 1995; 21: 195-218.
- McGlone JJ, Lumpkin EA, Norman RL. Adrenocorticotropin stimulates natural killer cell activity. *Endocrinology* 1991; 129: 1653-8.
- McGregor R, Spagnuolo P, Lentneck A. Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone and aspirin measured with a new assay system. *New Engl J Med* 1974; 26: 642-6.
- McLinden KA, Kranjac D, Deodati LE, Kahn M, Chumley MJ, Boehm GW. Age exacerbates sickness behaviour following exposure to a viral mimetic. *Physiol Behav* 2012; 105: 1219-25.
- McNerlan SE, Rea IM, Alexander HD. A whole blood method for measurement of intracellular TNF-alpha, IFN-gamma and IL-2 expression in stimulated CD3+ lymphocytes: differences between young and elderly subjects. *Exp Gerontol* 2002; 37: 227-34.
- Mecocci P. Oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer disease: A continuum. *J Alzheimers Dis* 2004; 6: 159-63.
- Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1243-8.
- Medina S, Del Río M, Hernanz A, De la Fuente M. Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukin-2 production. *Peptides* 2000a; 21: 1403-9.
- Medina S, Del Río M, Hernanz A, De la Fuente M. The NPY effects on murine leukocyte adherence and chemotaxis change with age. Adherent cell implication. *Regul Pept* 2000b; 95: 35-45.
- Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* 1990; 65: 375-98.
- Meijer JH, Schwartz WJ. In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 2003; 18: 235-49.
- Melchart D, Martin P, Hallek M, Holzmann M, Jurcic X, Wagner H. Circadian variation of the phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes and of various other parameters in 13 healthy male adults. *Chronobiol Int* 1992; 9: 35-45.

- Meydani SN, Wu D, Santos MS, Hayek MG. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1462S-76S.
- Migliore L, Fontana I, Trippi F, Colognato R, Coppedè F, Tognoni G, Nucciarone B, Siciliano G. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 567-73.
- Milaneschi Y, Cesari M, Simonsick EM, Vogelzangs N, Kanaya AM, Yaffe K, Patrignani P, Metti A, Kritchevsky SB, Pahor M, Ferrucci L, Penninx BW; Health ABC study. Lipid peroxidation and depressed mood in community-dwelling older men and women. *PLoS One* 2013; 8: e65406.
- Miles EA, Thies F, Wallace FA, Powell JR, Hurst TL, Newsholme EA, Calder PC. Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble adhesion molecule concentrations. *Clin Sci (Lond)* 2001; 100: 91-100.
- Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Peña-Silva R, Heistad DD. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 843-50.
- Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 1998; 33: 113-26.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980; 15: 575-91.
- Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Muñoz FJ, Ruiz F, Leighton F, Inestrosa NC. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2000; 62: 633-48.
- Miravittles M, Soriano JB, García-Río F, Muñoz L, Duran-Tauleria E, Sanchez G, Sobradillo V, Ancochea J. Prevalence of COPD in Spain: impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax* 2009; 64: 863-8.
- Mishima K, Okawa M, Shimizu T, Hishikawa Y. Diminished melatonin secretion in the elderly caused by insufficient environmental illumination. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 129-34.
- Mitnitski AB, Graham JE, Mogilner AJ, Rockwood K. Frailty, fitness and late-life mortality in relation to chronological and biological age. *BMC Geriatr* 2002; 2: 1.
- Miyaji C, Watanabe H, Toma H, Akisaka M, Tomiyama K, Sato Y, Abo T. Functional alteration of granulocytes, NK cells, and natural killer T cells in centenarians. *Hum Immunol* 2000; 61: 908-16.
- Miyawaki T, Taga K, Nagaoki T, Seki H, Suzuki Y, Taniguchi N. Circadian changes of T lymphocyte subsets in human peripheral blood. *Clin Exp Immunol* 1984; 55: 618-22.
- Mizwicki MT, Liu G, Fiala M, Magpantay L, Sayre J, Siani A, Mahanian M, Weitzman R, Hayden EY, Rosenthal MJ, Nemere I, Ringman J, Teplow DB. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3

- and resolvin D1 retune the balance between amyloid- $\beta$  phagocytosis and inflammation in Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 2013; 34: 155-70.
- Mocchegiani E, Malavolta M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell* 2004; 3: 177-184.
- Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R, Cipriano C, Gasparini N, Franceschi C, Gaetti R, Cavalieri E, Suzuki H. Metallothioneins/PARP-1/IL-6 interplay on natural killer cell activity in elderly: parallelism with nonagenarians and old infected humans. Effect of zinc supply. *Mech Ageing Dev* 2003; 124: 459-68.
- Molinuevo JL. Papel de los biomarcadores en el diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2011; 46: 39-41.
- Moore CB, Siopes TD. Effects of lighting conditions and melatonin supplementation on the cellular and humoral immune responses in Japanese quail *Coturnix coturnix japonica*. *Gen Comp Endocrinol* 2000; 119: 95-104.
- Morale MC, Gallo F, Tirollo C, Testa N, Caniglia S, Marletta N, Spina-Purrello V, Avola R, Caucci F, Tomasi P, Delitala G, Barden N, Marchetti B. Neuroendocrine-immune (NEI) circuitry from neuron-glial interactions to function: Focus on gender and HPA-HPG interactions on early programming of the NEI system. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 400-17.
- Morel F, Doussiere J, Vignais PV. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 1991; 201: 523-46.
- Morin CL, Pagliassotti MJ, Windmiller D, Eckel RH. Adipose tissue-derived tumor necrosis factor- $\alpha$  activity is elevated in older rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1997; 52: B190-5.
- Mórocz M, Kálmán J, Juhász A, Sinkó I, McGlynn AP, Downes CS, Janka Z, Raskó I. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 47-53.
- Moroni F, Di Paolo ML, Rigo A, Cipriano C, Giacconi R, Recchioni R, Marcheselli F, Malavolta M, Mocchegiani E. Interrelationship among neutrophil efficiency, inflammation, antioxidant activity and zinc pool in very old age. *Biogerontology* 2005; 6: 271-81.
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-46.
- Motzkus D, Albrecht U, Maronde E. The human PER1 gene is inducible by interleukin-6. *J Mol Neurosci* 2002; 18: 105-9.
- Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Hum Pathol* 1995; 26: 816-23.
- Muirhead KE, Borger E, Aitken L, Conway SJ, Gunn-Moore FJ. The consequences of mitochondrial amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Biochem J* 2010; 426: 255-70.

- Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 2000; 72: 391-8.
- Mulak A, Taché Y, Larauche M. Sex hormones in the modulation of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2433-48.
- Mulero J, Zafrilla P, Martinez-Cacha A. Oxidative stress, frailty and cognitive decline. *J Nutr Health Aging* 2011; 15: 756-60.
- Müller-Alouf H, Alouf JE, Gerlach D, Ozegowski JH, Fitting C, Cavaillon JM. Comparative study of cytokine release by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Streptococcus pyogenes* superantigenic erythrogenic toxins, heat-killed streptococci, and lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1994; 62: 4915-21.
- Murciano C, Yáñez A, O'Connor JE, Gozalbo D, Gil ML. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53: 214-21.
- Myśliwska J, Bryl E, Foerster J, Myśliwski A. Increase of interleukin 6 and decrease of interleukin 2 production during the ageing process are influenced by the health status. *Mech Ageing Dev* 1998; 100: 313-28.
- Myśliwska J, Bryl E, Foerster J, Myśliwski A. The upregulation of TNF alpha production is not a generalised phenomenon in the elderly between their sixth and seventh decades of life. *Mech Ageing Dev* 1999; 107: 1-14.
- Myśliwski A, Myśliwska J, Chodnik T, Bigda J, Bryl E, Foerster J. Elderly high NK responders are characterized by intensive proliferative response to PHA and Con A and optimal health status. *Arch Gerontol Geriatr* 1993; 16: 199-205.
- Nadeem A, Raj HG, Chhabra SK. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation* 2005; 29: 23-32.
- Nagel JE, Chopra RK, Chrest FJ, McCoy MT, Schneider EL, Holbrook NJ, Adler WH. Decreased proliferation, interleukin 2 synthesis, and interleukin 2 receptor expression are accompanied by decreased mRNA expression in phytohemagglutinin-stimulated cells from elderly donors. *J Clin Invest* 1988; 81: 1096-102.
- Nakamura TJ, Nakamura W, Yamazaki S, Kudo T, Cutler T, Colwell CS, Block GD. Age-related decline in circadian output. *J Neurosci* 2011; 31: 10201-5.
- Nakanishi H, Hayashi Y, Wu Z. The role of microglial mtDNA damage in age-dependent prolonged LPS-induced sickness behaviour. *Neuron Glia Biol* 2011; 7: 17-23.
- Nakbi A, Koubaa N, Ben Hamda K, Hammami S, Attia N, Boumiza R, Miled A, Ben Farhat M, Hammami M. [Association between oxidative stress parameters and inflammation markers according to the gravity of the acute coronary syndrome]. *Tunis Med* 2011; 89: 621-6.

- Nelson RJ. Seasonal immune function and sickness responses. *Trends Immunol* 2004; 25: 187-92.
- Nelson RJ, Demas GE. Seasonal changes in immune function. *Q Rev Biol* 1996; 71: 511-48.
- Nelson RJ, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ. The influence of season, photoperiod, and pineal melatonin on immune function. *J Pineal Res* 1995; 19: 149-65.
- Nelson RJ, Drazen DL. Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917: 404-15.
- Nicolau GY, Haus E. Chronobiologic reference values in clinical chemistry. *Endocrinologie* 1989; 27: 197-230.
- Niehaus GD, Ervin E, Patel A, Khanna K, Vanek VW, Fagan DL. Circadian variation in cell-adhesion molecule expression by normal human leukocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 935-40.
- Niwa Y, Kasam T, Miyachi Y, Kanoh T. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: cross-sectional and longitudinal studies. *Life Sci* 1989; 44: 1655-64.
- Noda M, Suzumura A. Sweepers in the CNS: microglial migration and phagocytosis in the Alzheimer disease pathogenesis. *Int J Alzheimers Dis* 2012; 891087.
- Noelle RJ, Nowak EC. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 683-7.
- Noga SJ, Normann SJ, Weiner RS. Methods in laboratory investigation. Isolation of guinea pig monocytes and Kurloff cells: characterization of monocyte subsets by morphology, cytochemistry, and adherence. *Lab Invest* 1984; 51: 244-52.
- Noguera A, Batle S, Miralles C, Iglesias J, Busquets X, MacNee W, Agustí AG. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001; 56: 432-7.
- Noguera A, Busquets X, Sauleda J, Villaverde JM, MacNee W, Agustí AG. Expression of adhesion molecules and G proteins in circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1664-8.
- Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH 3rd, De S, Ejiogu N, Zhang Y, Mattison JA, Becker KG, Zonderman AB, Evans MK. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging (Albany NY)* 2013; 5: 725-40.
- Nour Eldin EE, Almarzouki A, Assiri AM, Elsheikh OM, Mohamed BE, Babakr AT. Oxidized low density lipoprotein and total antioxidant capacity in type-2 diabetic and impaired glucose tolerance Saudi men. *Diabetol Metab Syndr* 2014; 6: 94.
- Núñez-Naveira L, Montero-Martínez C, Ramos-Barbón D. Oxidation, inflammation and structural modifications in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol* 2007; 43: 18-29.

- Nygård M, Hill RH, Wikström MA, Kristensson K. Age-related changes in electrophysiological properties of the mouse suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res Bull* 2005; 65: 149–54.
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 2006; 26: 10129-40.
- O'Brien SM, Fitzgerald P, Scully P, Landers A, Scott LV, Dinan TG. Impact of gender and menstrual cycle phase on plasma cytokine concentrations. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14: 84-90.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003a; 24: 1063–70.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Aβ and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003b; 39: 409-21.
- Ogata K, An E, Shioi Y, Nakamura K, Luo S, Yokose N, Minami S, Dan K. Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people. *Clin Exp Immunol* 2001; 124: 392–7.
- Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, Nomura T. Natural killer cells in the later decades of human life. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84: 269-75.
- Ogha E, Nagase T, Tomita T, Teramoto S, Matsuse T, Katayama H, Ouchi Y. Increased levels of circulating ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in obstructive sleep apnea syndrome. *J Appl Physiol* 1999; 87: 10-4.
- Ohdo S, Koyanagi S, Suyama H, Higuchi S, Aramaki H. Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. *Nat Med* 2001; 7: 356–60.
- Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 1973; 41: 181-90.
- O'Mahony L, Holland J, Jackson J, Feighery C, Hennessy TP, Mealy K. Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 213-9.
- Omar RA, Chyan YJ, Andorn AC, Poeggeler B, Robakis NK, Pappolla MA. Increased expression but reduced activity of antioxidant enzymes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 1999; 1: 139–45.



- Ongrádi J, Kövesdi V. Factors that may impact on immunosenescence: an appraisal. *Immun Ageing* 2010; 7: 7.
- Ortega E, Garcia JJ, De La Fuente M. Ageing modulates some aspects of the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp Physiol* 2000; 85: 519-25.
- Oudijk EJ, Lammers JW, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 2003; 46: 5s-13s.
- Oudijk EJ, Nijhuis EH, Zwank MD, van de Graaf EA, Mager HJ, Coffey PJ, Lammers JW, Koenderman L. Systemic inflammation in COPD visualised by gene profiling in peripheral blood neutrophils. *Thorax* 2005; 60: 538-44.
- Pamplona R, Barja G. Aging rate, free radical production, and constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from comparative studies. En: Van Zglinicki T (ed). *Biology of aging and its modulation series. Vol 1. Aging at the Molecular Level, New Molecular Level*. New York: Kluwer Academic Publishers 2003; pp. 47-64.
- Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, Lord JM, Shaw AC. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* 2009; 30: 325-33.
- Pandey KB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3: 2-12.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal?. *FEBS J* 2006; 273: 2813-38.
- Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 46: 214-23.
- Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Manzella D, Gambardella A, Varricchio M. Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J Am Geriatr Soc* 1998; 46: 833-8.
- Pappolla MA, Omar RA, Kim KS, Robakis NK. Immunohistochemical evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1992; 140: 621-8.
- Paredes SD, Terrón MP, Marchena AM, Barriga C, Pariente JA, Reiter RJ, Rodríguez AB. Effect of exogenous melatonin on viability, ingestion capacity, and free-radical scavenging in heterophils from Young and old ringdoves (*Streptopelia risoria*). *Mol Cell Biochem* 2007; 304: 305-14.
- Parizadeh MR, Azarpazhooh MR, Mobarra N, Nematy M, Alamdari DH, Tavalaei S, Sahebkar A, Hassankhani B, Ferns G, Ghayour-Mobarhan M. Prooxidant-antioxidant balance in stroke patients and 6-month prognosis. *Clin Lab* 2011; 57: 183-91.
- Pawelec G. Hallmarks of human "immunosenescence": adaptation or dysregulation?. *Immun Ageing* 2012; 9: 15.

- Pawelec G, Adibzadeh M, Pohla H, Schaudt K. Immunosenescence: ageing of the immune system. *Immunol Today* 1995; 16: 420-2.
- Pawelec G, Mariani E, Bradley B, Solana R. Longevity in vitro of human CD4+ T helper cell clones derived from young donors and elderly donors, or from progenitor cells: age-associated differences in cell surface molecule expression and cytokine secretion. *Biogerontology* 2000; 1: 247-54.
- Pawelec G, Ouyang Q, Colonna-Romano G, Candore G, Lio D, Caruso C. Is human immunosenescence clinically relevant? Looking for 'immunological risk phenotypes'. *Trends Immunol* 2002; 23: 330-2.
- Pawelec G, Solana R, Remarque E, Mariani E. Impact of aging on innate immunity. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 703-12.
- Pedersen BK, Steensberg A, Keller P, Keller C, Fischer C, Hiscock N, van Hall G, Plomgaard P, Febbraio MA. Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch* 2003a; 446: 9-16.
- Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol* 2001; 536: 329-37.
- Pedersen M, Bruunsgaard H, Weis N, Hendel HW, Andreassen BU, Eldrup E, Dela F, Pedersen BK. Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes. *Mech Ageing Dev* 2003b; 124: 495-502.
- Perskin MH, Cronstein BN. Age-related changes in neutrophil structure and function. *Mech Ageing Dev* 1992; 64: 303-13.
- Peskind ER, Li G, Shofer JB, Millard SP, Leverenz JB, Yu CE, Raskind MA, Quinn JF, Galasko DR, Montine TJ. Influence of lifestyle modifications on age-related free radical injury to brain. *JAMA Neurol* 2014; 71: 1150-4.
- Petrovsky N. Temporal regulation of the human immune system. *Expert Rev Clin Immunol* 2005; 1: 379-83.
- Petrovsky N, Harrison LC. Th1 and Th2: swinging to a hormonal rhythm. *Immunol Today* 1995; 16: 605.
- Petrovsky N, Harrison LC. The chronobiology of human cytokine production. *Int Rev Immunol* 1998; 16: 635-49.
- Petrovsky N, McNair P, Harrison LC. Diurnal rhythms of pro-inflammatory cytokines: regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. *Cytokine* 1998; 10: 307-12.
- Pietschmann P, Gollob E, Brosch S, Hahn P, Kudlacek S, Willheim M, Woloszczuk W, Peterlik M, Tragl KH. The effect of age and gender on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells and markers of bone metabolism. *Exp Gerontol* 2003; 38: 1119-27.

- Pirabbasi E, Najafiyan M, Cheraghi M, Shahar S, Abdul Manaf Z, Rajab N, Abdul Manap R. What are the antioxidant status predictors' factors among male chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients?. *Glob J Health Sci* 2012; 5: 70-8.
- Pitychoutis PM, Papadopoulou-Daifoti Z. Of depression and immunity: does sex matter?. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; 13: 675-89.
- Plasqui G, Westerterp KR. Seasonal variation in total energy expenditure and physical activity in Dutch young adults. *Obes Res* 2004; 12: 688-94.
- Plicner D, Mazur P, Sadowski J, Undas A. Asymmetric dimethylarginine and oxidative stress following coronary artery bypass grafting: associations with postoperative outcome. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014; 45: e136-41.
- Pollmächer T, Haack M, Schuld A, Reichenberg A, Yirmiya R. Low levels of circulating inflammatory cytokines—do they affect human brain functions?. *Brain Behav Immun* 2002; 16: 525–32.
- Pooler AM, Noble W, Hanger DP. A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology* 2014; 76: 1-8.
- Prieto A, Reyes E, Bernstein ED, Martinez B, Monserrat J, Izquierdo JL, Callol L, de Lucas P, Alvarez-Sala R, Alvarez-Sala JL, Villarrubia VG, Alvarez-Mon M. Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoposphopeptical (inmunoferón). *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1578-83.
- Prinz PN. Age impairments in sleep, metabolic and immune functions. *Exp Gerontol* 2004; 39: 1739-43.
- Priyanka HP, Sharma U, Gopinath S, Sharma V, Hima L, ThyagaRajan S. Menstrual cycle and reproductive aging alters immune reactivity, NGF expression, antioxidant enzyme activities, and intracellular signaling pathways in the peripheral blood mononuclear cells of healthy women. *Brain Behav Immun* 2013; 32: 131-43.
- Proffenno LA, Porsteinsson AP, Faraone SV. Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry* 2010; 67: 505-12.
- Prohan M, Amani R, Nematpour S, Jomehzadeh N, Haghighizadeh MH. Total antioxidant capacity of diet and serum, dietary antioxidant vitamins intake, and serum hs-CRP levels in relation to depression scales in university male students. *Redox Rep* 2014; 19: 133-9.
- Prolo P, Chiappelli F, Angeli A, Dovio A, Perotti P, Pautasso M, Sartori ML, Saba L, Mussino S, Fraccalini T, Fantó F, Mocellini C, Rosso MG, Grasso E. Physiologic modulation of natural killer cell activity as an index of Alzheimer's disease progression. *Bioinformation* 2007; 1: 363-6.
- Ptitsyn AA, Zvonic S, Gimble JM. Digital signal processing reveals circadian baseline oscillation in majority of mammalian genes. *PLoS Comput Biol* 2007; 3: e120.

- Puertas MC, Martínez-Martos JM, Cobo MP, Carrera MP, Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ. Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp Gerontol* 2012; 47: 625-30.
- Puerto M, Guayerbas N, Alvarez P, De la Fuente M. Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol* 2005; 165: 33-40.
- Puerto M, Guayerbas N, Víctor VM, De la Fuente M. Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73: 797-804.
- Pulsatelli L, Meliconi R, Mazzetti I, Dolzani P, Meneghetti A, Neri S, Silvestri T, Ravaglia G, Forti P, Facchini A, Mariani E. Chemokine production by peripheral blood mononuclear cells in elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 2000; 121: 89-100.
- Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532-55.
- Radovanovic S, Savic-Radojevic A, Pekmezovic T, Markovic O, Memon L, Jelic S, Simic D, Radic T, Pljesa-Ercegovac M, Simic T. Uric acid and gamma-glutamyl transferase activity are associated with left ventricular remodeling indices in patients with chronic heart failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2014; 67: 632-42.
- Radovanovic S, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Djukic T, Suvakov S, Krotin M, Simic DV, Matic M, Radojicic Z, Pekmezovic T, Simic T. Markers of oxidative damage and antioxidant enzyme activities as predictors of morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 2012; 18: 493-501.
- Raherison C, Girodet PO. Epidemiology of COPD. *Eur Respir Rev* 2009; 18: 213-21.
- Rahman I. Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1: 291-315.
- Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 1999; 277: L1067-88.
- Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1055-60.
- Rahsepar AA, Mirzaee A, Moodi F, Moohebaty M, Tavallaie S, Khorashadizadeh F, Mottahedi B, Esfahanizadeh J, Azari A, Sajjadian M, Khojasteh R, Paydar R, Mousavi S, Amini M, Ghayour-Mobarhan M, Ferns GA. Prooxidant-antioxidant balance and cardiac function in

- patients with cardiovascular disease following cardiac surgery. *J Heart Valve Dis* 2013; 22: 408-17.
- Rajadas J, Sun W, Li H, Inayathullah M, Cereghetti D, Tan A, de Mello Coelho V, Chrest FJ, Kusiak JW, Smith WW, Taub D, Wu JC, Rifkind JM. Enhanced A $\beta$ (1–40) production in endothelial cells stimulated with fibrillar A $\beta$ (1–42). *PLoS One* 2013; 8: e58194.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 1990; 247: 975–8.
- Rani AJ, Mythili SV. Study on total antioxidant status in relation to oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Diagn Res* 2014; 8: 108-10.
- Rattan SI. Gerontogenes: real or virtual?. *FASEB J* 1995; 9: 284-6.
- Rauk A. Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic?. *Dalton Trans* 2008: 1273-82.
- Rawat DK, Alzoubi A, Gupte R, Chettimada S, Watanabe M, Kahn AG, Okada T, McMurtry IF, Gupte SA. Increased reactive oxygen species, metabolic maladaptation, and autophagy contribute to pulmonary arterial hypertension-induced ventricular hypertrophy and diastolic heart failure. *Hypertension* 2014; 64: 1266-74.
- Ray P, Ghosh SK, Zhang DH, Ray A. Repression of interleukin-6 gene expression by 17  $\beta$ -estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF- $\kappa$ B by the estrogen receptor. *FEBS Lett* 1997; 409: 79–85.
- Recuero M, Vicente MC, Martínez-García A, Ramos MC, Carmona-Saez P, Sastre I, Aldudo J, Vilella E, Frank A, Bullido MJ, Valdivieso F. A free radical-generating system induces the cholesterol biosynthesis pathway: a role in Alzheimer's disease. *Aging Cell* 2009; 8: 128–39.
- Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; 49: 654-64.
- Reiter RJ. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol* 1995; 30: 199-212.
- Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418: 935-41.
- Reyes E, Prieto A, de la Hera A, de Lucas P, Alvarez-Sala R, Alvarez-Sala JL, Alvarez-Mon M. Treatment with AM3 restores defective T-cell function in COPD patients. *Chest* 2006; 129: 527-35.
- Rezai-Zadeh K, Gate D, Gowing G, Town T. How to get from here to there: macrophage recruitment in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8: 156-63.
- Riancho JA, Zarrabeitia MT, Amado JA, Olmos JM, González-Macías J. Age-related differences in cytokine secretion. *Gerontology* 1994; 40: 8-12.

- Richartz E, Stransky E, Batra A, Simon P, Lewczuk P, Buchkremer G, Bartels M, Schott K. Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease?. *J Psychiatr Res* 2005; 39: 535-43.
- Richartz-Salzbunger E, Batra A, Stransky E, Laske C, Köhler N, Bartels M, Buchkremer G, Schott K. Altered lymphocyte distribution in Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* 2007; 41: 174-8.
- Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347: 1557-65.
- Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 915-9.
- Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech Ageing Dev* 1998; 102: 199-209.
- Ritchie AWS, Oswald I, Micklem HS, Boyd JE, Elton RA, Jazwinska E, James K. Circadian variation of lymphocyte subpopulations: a study with monoclonal antibodies. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983; 286: 1773-5.
- Rizvi SI, Jha R, Maurya PK. Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging. *Rejuvenation Res* 2006; 9: 470-4.
- Rizvi SI, Maurya PK. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Mol Biotechnol* 2007; 37: 58-61.
- Rochat S, Cumming RG, Blyth F, Creasey H, Handelsman D, Le Couteur DG, Naganathan V, Sambrook PN, Seibel MJ, Waite L. Frailty and use of health and community services by community-dwelling older men: the Concord Health and Ageing in Men Project. *Age Ageing* 2010; 39: 228-33.
- Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers* 2013; 35: 773-90.
- Rodríguez AB, Marchena JM, Nogales G, Durán J, Barriga C. Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis, and superoxide anion levels in *rig dove* heterophils. *J Pineal Res* 1999; 26: 35-42.
- Roenneberg T, Aschoff J. Annual rhythm of human reproduction: II. Environmental correlations. *J Biol Rhythms* 1990; 5: 217-39.
- Rogers J, Lue LF. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2001; 39: 333-40.

- Roubenoff R, Harris TB, Abad LW, Wilson PW, Dallal GE, Dinarello CA. Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998; 53: M20-6.
- Roy B, Singh R, Kumar S, Rai U. Diurnal variation in phagocytic activity of splenic phagocytes in freshwater teleost *Channa punctatus*: melatonin and its signalling mechanism. *J Endocrinol* 2008; 199: 471-80.
- Ryu JK, Cho T, Choi HB, Wang YT, McLarnon JG. Microglial VEGF receptor response is an integral chemotactic component in Alzheimer's disease pathology. *J Neurosci* 2009; 29: 3–13.
- Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Vollmer WM, Singer CM. Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res* 1986; 3: 379-88.
- Sadeghi HM, Schnelle JF, Thoma JK, Nishanian P, Fahey JL. Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. *Exp Gerontol* 1999; 34: 959-70.
- Sadki A, Bentivoglio M, Kristensson K, Nygård M. Supressors, receptors and effects of cytokines on the aging mouse biological clock. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 296-305.
- Saito T, Yasukawa K, Suzuki H, Futatsugi K, Fukunaga T, Yokomizo C, Koishihara Y, Fukui H, Ohsugi Y, Yawata H, *et al.* Preparation of soluble murine IL-6 receptor and anti-murine IL-6 receptor antibodies. *J Immunol* 1991; 147: 168-73.
- Sakata-Kaneko S, Wakatsuki Y, Matsunaga Y, Usui T, Kita T. Altered Th1/Th2 commitment in human CD4+ T cells with ageing. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 267–73.
- Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev* 2008; 7: 83-105.
- Salminen A, Kaarniranta K. Genetics vs. entropy: longevity factors suppress the NF-kappaB-driven entropic aging process. *Ageing Res Rev* 2010; 9: 298-314.
- Salvioli S, Capri M, Valensin S, Tieri P, Monti D, Ottaviani E, Franceschi C. Inflamm-aging, cytokines and aging: State of the art, new hypotheses on the role of mitochondria and new perspectives from systems biology. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 3161-71.
- Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P Jr, Reed RL, Jones DP. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 699-704.
- Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K, Andersen-Ranberg K, Schroll M, Jeune B. High circulating levels of tumor necrosis factor-alpha in centenarians are not associated with increased production in T lymphocytes. *Gerontology* 2003; 49: 155-60.

- Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, Telera A, Lucchini G, Passeri G, Monti D, Franceschi C, Passeri M. The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol* 2008; 43: 61-5.
- Santos RR, Torres KC, Lima GS, Fiamoncini CM, Mapa FC, Pereira PA, Rezende VB, Martins LC, Bicalho MA, Moraes EN, Reis HJ, Teixeira AL, Romano-Silva MA. Reduced frequency of T lymphocytes expressing CTLA-4 in frontotemporal dementia compared to Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2014; 48: 1-5.
- Sapey E, Greenwood H, Walton G, Mann E, Love A, Aaronson N, Insall RH, Stockley RA, Lord JM. Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence. *Blood* 2014; 123: 239-48.
- Sarkar D, Fisher PB. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett* 2006; 236: 13-23.
- Sasaki A, Shoji M, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Ikeda M, Naito M, Matsubara E, Abe K, Nakazato Y. Amyloid cored plaques in Tg2576 transgenic mice are characterized by giant plaques, slightly activated microglia, and the lack of paired helical filament-typed, dystrophic neurites. *Virchows Arch* 2002; 441: 358-67.
- Sastre J, Pallardo FV, García de la Asunción J, Viña J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 2000; 32: 189-98.
- Satinoff E, Li H, Tcheng TK, Liu C, McArthur AJ, Medanic M, Gillette MU. Do the suprachiasmatic nuclei oscillate in old rats as they do in young ones?. *Am J Physiol* 1993; 265: R1216-22.
- Saurwein-Teissl M, Blasko I, Zisterer K, Neuman B, Lang B, Grubeck-Loebenstien B. An imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, a characteristic feature of old age. *Cytokine* 2000; 12: 1160-1.
- Savu O, Ionescu-Tirgoviste C, Atanasiu V, Gaman L, Papacoea R, Stoian I. Increase in total antioxidant capacity of plasma despite high levels of oxidative stress in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *J Int Med Res* 2012; 40: 709-16.
- Scali C, Prosperi C, Bracco L, Piccini C, Baronti R, Ginestroni A, Sorbi S, Pepeu G, Casamenti F. Neutrophils CD11b and fibroblasts PGE(2) are elevated in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 523-30.
- Scheibler E, Wollnik F. Interspecific contact affects phase response and activity in Desert hamsters. *Physiol Behav* 2009; 98: 288-95.
- Schindowski K, Eckert A, Peters J, Gorriz C, Schramm U, Weinandi T, Maurer K, Frölich L, Müller WE. Increased T-cell reactivity and elevated levels of CD8+ memory T-cells in Alzheimer's disease-patients and T-cell hyporeactivity in an Alzheimer's disease-mouse model: implications for immunotherapy. *Neuromolecular Med* 2007; 9: 340-54.



- Schmid HA, Requintina PJ, Oxenkrug GF, Sturner W. Calcium, calcification, and melatonin biosynthesis in the human pineal gland: a post-mortem study into age-related factors. *J Pineal Res* 1994; 16: 178-83.
- Schmidt-loanas M, Pletz MW, de Roux A, Lode H. Apoptosis of peripheral blood neutrophils in COPD exacerbation does not correlate with serum cytokines. *Respir Med* 2006; 100: 639-47.
- Schrag M, Mueller C, Zabel M, Crofton A, Kirsch WM, Ghribi O, Squitti R, Perry G. Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiol Dis* 2013; 59: 100-10.
- Schröder AK, Rink L. Neutrophil immunity of the elderly. *Mech Ageing Dev* 2003; 124: 419-25.
- Schubert T, Muller WE. N-formil-methionyl-leucil-phenilalanine induced accumulation of inositol phosphate indicates the presence of oligopeptide chemoattractant receptors on circulating human lymphocytes. *FEBS Letters* 1989; 257: 174-6.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4904-11.
- Schwarz JM, Bilbo SD. Sex, glia, and development: interactions in health and disease. *Horm Behav* 2012; 62: 243-53.
- Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 924: 17-25.
- Sellix MT, Evans JA, Leise TL, Castanon-Cervantes O, Hill DD, DeLisser P, Block GD, Menaker M, Davidson AJ. Aging differentially affects the re-entrainment response of central and peripheral circadian oscillators. *J Neurosci* 2012; 32: 16193-202.
- Selvaraju V, Joshi M, Suresh S, Sanchez JA, Maulik N, Maulik G. Diabetes, oxidative stress, molecular mechanism, and cardiovascular disease--an overview. *Toxicol Mech Methods* 2012; 22: 330-5.
- Serviddio G, Romano AD, Greco A, Rollo T, Bellanti F, Altomare E, Vendemiale G. Frailty syndrome is associated with altered circulating redox balance and increased markers of oxidative stress. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009; 22: 819-27.
- Shahar DR, Yerushalmi N, Lubin F, Froom P, Shahar A, Kristal-Boneh E. Seasonal variations in dietary intake affect the consistency of dietary assessment. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 129-33.
- Shalit F, Sredni B, Brodie C, Kott E, Huberman M. T lymphocyte subpopulations and activation markers correlate with severity of Alzheimer's disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 75: 246-50.

- Sharma G, Hanania NA, Shim YM. The aging immune system and its relationship to the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 573–80.
- Sharma R, Kapila R, Haq MR, Salingati V, Kapasiya M, Kapila S. Age-associated aberrations in mouse cellular and humoral immune responses. *Aging Clin Exp Res* 2014; 26: 353-62.
- Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 507-13.
- Shearer GM. Th1/Th2 changes in aging. *Mech Ageing Dev* 1997; 94: 1-5.
- Shibata N, Kobayashi M. The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Brain Nerve* 2008; 60: 157-70.
- Siddiqui AH, Gulati R, Tauheed N, Pervez A. Correlation of Waist-to-hip Ratio (WHR) and Oxidative Stress in Patients of Acute Myocardial Infarction (AMI). *J Clin Diagn Res* 2014; 8: 4-7.
- Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem* 1986; 25: 1058-71.
- Simell B, Vuorela A, Ekström N, Palmu A, Reunanen A, Meri S, Käyhty H, Väkeväinen M. Aging reduces the functionality of anti-pneumococcal antibodies and the killing of *Streptococcus pneumoniae* by neutrophil phagocytosis. *Vaccine* 2011; 29: 1929–34.
- Simioni PU, Costa EH, Tamashiro WM. Aging reduces the primary humoral response and the in vitro cytokine production in mice. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 1111-20.
- Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 325–5.
- Sinden NJ, Stockley RA. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: a result of 'overspill' of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax* 2010; 65: 930-6.
- Siomek A, Gackowski D, Rozalski R, Dziaman T, Szpila A, Guz J, Olinski R. Higher leukocyte 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and lower plasma ascorbate in aging humans?. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 143-50.
- Skene DJ, Swaab DF. Melatonin rhythmicity: effect of age and Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2003; 38: 199–206.
- Snyderman R, Pike MC. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. *Ann Rev Immunol* 1984; 2: 257-81.
- Sofic E, Rustembegovic A, Kroyer G, Cao G. Serum antioxidant capacity in neurological, psychiatric, renal diseases and cardiomyopathy. *J Neural Transm* 2002; 109: 711-9.
- Solana R, Alonso MC, Peña J. Natural killer cells in healthy aging. *Exp Gerontol* 1999; 34: 435-43.

- Solana R, Mariani E. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine* 2000; 18: 1613-20.
- Song C, Vandewoude M, Stevens W, De Clerck L, Van der Planken M, Whelan A, Anisman H, Dossche A, Maes M. Alterations in immune functions during normal aging and Alzheimer's disease. *Psychiatry Res* 1999; 85: 71-80.
- Song L, Kim YH, Chopra RK, Proust JJ, Nagel JE, Nordin AA, Adler WH. Age-related effects in T cell activation and proliferation. *Exp Gerontol* 1993; 28: 313-21.
- Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Kanabrocki EL, Yager JG, Roodell MM, Weatherbee JA, Young MR, Nenchausky BM, Scheving LE. Circadian characteristics of circulating interleukin-6 in men. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 1029-35.
- Speciale L, Calabrese E, Saresella M, Tinelli C, Mariani C, Sanvito L, Longhi R, Ferrante P. Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 1163-9.
- Squitti R, Bressi F, Pasqualetti P, Bonomini C, Ghidoni R, Binetti G, Cassetta E, Moffa F, Ventriglia M, Vernieri F, Rossini PM. Longitudinal prognostic value of serum "free" copper in patients with Alzheimer disease. *Neurology* 2009; 72: 50-5.
- Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero MI, Rossaint J, Bilbao I, Náchér M, Pitaval C, Radovanovic I, Fukui Y, McEver RP, Filippi MD, Lizasoain I, Ruiz-Cabello J, Zarbock A, Moro MA, Hidalgo A. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 2014; 346: 1234-9.
- Srinivasan V, Spence DW, Trakht I, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP, Maestroni GJ. Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 93-101.
- Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E433-7.
- Sterniczuk R, Antle MC, LaFerla FM, Dyck RH. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Res* 2010; 1348: 149-55.
- Stieler JT, Lederer C, Brückner MK, Wolf H, Holzer M, Gertz HJ, Arendt T. Impairment of mitogenic activation of peripheral blood lymphocytes in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2001; 12: 3969-72.
- Stohlawetz P, Kolussi T, Jahandideh-Kazempour S, Kudlacek S, Graninger W, Willvonseder R, Pietschmann P. The effect of age on the transendothelial migration of human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 1996; 44: 530-4.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 2001; 291: 490-3.

- Straface E, Matarrese P, Gambardella L, Vona R, Sgadari A, Silveri MC, Malorni W. Oxidative imbalance and cathepsin D changes as peripheral blood biomarkers of Alzheimer disease: a pilot study. *FEBS Lett* 2005; 579: 2759-66.
- Straub RH, Cutolo M, Zietz B, Schölmerich J. The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1591-611.
- Strehler BL. Time, cells and aging. New York: Academic Press 1977.
- Strindhall J, Nilsson BO, Löfgren S, Ernerudh J, Pawelec G, Johansson B, Wikby A. No Immune Risk Profile among individuals who reach 100 years of age: findings from the Swedish NONA immune longitudinal study. *Exp Gerontol* 2007; 42: 753-61.
- Sujino M, Masumoto KH, Yamaguchi S, van der Horst GT, Okamura H, Inouye ST. Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr Biol* 2003; 13: 664-8.
- Sultana R, Mecocci P, Mangialasche F, Cecchetti R, Baglioni M, Butterfield DA. Increased protein and lipid oxidative damage in mitochondria isolated from lymphocytes from patients with Alzheimer's disease: insights into the role of oxidative stress in Alzheimer's disease and initial investigations into a potential biomarker for this dementing disorder. *J Alzheimers Dis* 2011; 24: 77-84.
- Tacconi S, Perri R, Balestrieri E, Grelli S, Bernardini S, Annichiarico R, Mastino A, Caltagirone C, Macchi B. Increased caspase activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2004; 190: 254-62.
- Takizawa H. [Role of mediators in the onset of COPD]. *Nihon Rinsho* 2007; 65: 623-7.
- Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest* 2012; 122: 1316-38.
- Tamariz L, Hernandez F, Bush A, Palacio A, Hare JM. Association between serum uric acid and atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis. *Heart Rhythm* 2014; 11: 1102-8.
- Tang Y, Di Pietro L, Feng Y, Wang X. Increased TNF-alpha and PGI(2), but not NO release from macrophages in 18-month-old rats. *Mech Ageing Dev* 2000; 114: 79-88.
- Tarazona R, Solana R, Ouyang Q, Pawelec G. Basic biology and clinical impact of immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002; 37: 183-9.
- Tarquini B, Cornélissen G, Perfetto F, Tarquini R, Halberg F. Chronome assessment of circulating melatonin in humans. *In Vivo* 1997; 11: 473-84.
- Tavadia HB, Fleming KA, Hume PD, Simpson HW. Circadian rhythmicity of human plasma cortisol and PHA-induced lymphocyte transformation. *Clin Exp Immunol* 1975; 22: 190-3.

- Teboul M, Guillaumond F, Gréchez-Cassiau A, Delaunay F. The nuclear hormone receptor family round the clock. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 2573-82.
- Teclemariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J, Buijs RM. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol* 1999; 406: 171-82.
- Terron MP, Cubero J, Marchena JM, Barriga C, Rodriguez AB. Melatonin and aging: in vitro effect of young and mature ring dove physiological concentrations of melatonin on the phagocytic function of heterophils from old ring dove. *Exp Gerontol* 2002; 37: 421-6.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991; 30: 572-80.
- Tetley TD. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 607-18.
- Teunissen CE, van Boxtel MP, Bosma H, Bosmans E, Delanghe J, De Bruijn C, Wauters A, Maes M, Jolles J, Steinbusch HW, de Vente J. Inflammation markers in relation to cognition in a healthy aging population. *J Neuroimmunol* 2003; 134: 142-50.
- Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 1969; 17: 502-22.
- Tiffany HL, Lavigne MC, Cui YH, Wang JM, Leto TL, Gao JL, Murphy PM. Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *J Biol Chem* 2001; 276: 23645-52.
- Togo T, Akiyama H, Iseki E, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Oda T, Tsuchiya K, Kosaka K. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol* 2002; 124: 83-92.
- Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LM, Moreira WL, Loureiro AP, de Souza-Talarico JN, Smid J, Porto CS, Bottino CM, Nitrini R, Barros SB, Camarini R, Marcourakis T. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2011; 26: 59-68.
- Tortorella C, Piazzolla G, Antonaci S. Neutrophil oxidative metabolism in aged humans: a perspective. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001; 23: 565-72.
- Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Vella F, Pace L, Antonaci S. Regulatory role of extracellular matrix proteins in neutrophil respiratory burst during aging. *Mech Ageing Dev* 2000; 119: 69-82.
- Tosu AR, Demir S, Selcuk M, Kaya Y, Akyol A, Ozdemir M, Tenekecioglu E. Comparison of inflammatory markers in non-dipper hypertension vs. dipper hypertension and in

- normotensive individuals: uric acid, C-reactive protein and red blood cell distribution width readings. *Postepy Kardiol Interwencyjnej* 2014; 10: 98-103.
- Touitou Y, Bodgan A, Haus E, Touitou C. Modifications of circadian and circannual rhythms with aging. *Exp Gerontol* 1997; 32: 603-14.
- Touitou Y, Fèvre M, Lagoguey M, Carayon A, Bogdan A, Reinberg A, Beck H, Cesselin F, Touitou C. Age- and mental health-related circadian rhythms of plasma levels of melatonin, prolactin, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in man. *J Endocrinol* 1981; 91: 467-75.
- Town T, Tan J, Flavell RA, Mullan M. T-cells in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2005; 7: 255-64.
- Tseng BP, Kitazawa M, LaFerla FM. Amyloid beta-peptide: the inside story. *Curr Alzheimer Res* 2004; 1: 231-9.
- Tsukamoto K, Machida K. Effects of life events and stress on neutrophil functions in elderly men. *Immun Ageing* 2012; 9: 13.
- Tupe RS, Diwan AG, Mittal VD, Narayanam PS, Mahajan KB. Association of plasma proteins at multiple stages of glycation and antioxidant status with erythrocyte oxidative stress in patients with type 2 diabetes. *Br J Biomed Sci* 2014; 71: 93-9.
- Turek FW. From circadian rhythms to clock genes in depression. *Int Clin Psychopharmacol* 2007; 22: S1-8.
- Turek FW, Penev P, Zhang Y, van Reeth O, Zee P. Effects of age on the circadian system. *Neurosci Biobehav Rev* 1995; 19: 53-8.
- Uciechowski P, Kahmann L, Plümäkers B, Malavolta M, Mocchegiani E, Dedoussis G, Herbein G, Jajte J, Fulop T, Rink L. TH1 and TH2 cell polarization increases with aging and is modulated by zinc supplementation. *Exp Gerontol* 2008; 43: 493-8.
- Ueno LM, Yamashita Y, Moritani T, Nakamura E. Biomarkers of aging in women and the rate of longitudinal changes. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2003; 22: 37-46.
- Unno N. Utilization of oxidative stress biomarkers is important to assess treatment effects on exercise capacity in patients with intermittent claudication. *Circ J* 2014; 78: 1327-8.
- Uppal N, Uppal V, Uppal P. Progression of Coronary Artery Disease (CAD) from Stable Angina (SA) Towards Myocardial Infarction (MI): Role of Oxidative Stress. *J Clin Diagn Res* 2014; 8: 40-3.
- Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Altered effector function of peripheral cytotoxic cells in COPD. *Respir Res* 2009; 10: 53.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

- van Beurden WJ, Wielders PL, Scheepers PJ, van Herwaarden CL, Dekhuijzen PN. Superoxide production by peripheral polymorphonuclear leukocytes in patients with COPD. *Respir Med* 2003; 97: 401-6.
- Van den Bergh JP, van Geel TA, Geusens PP. Osteoporosis, frailty and fracture: implications for case finding and therapy. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 163-72.
- Van den Biggelaar AH, De Craen AJ, Gussekloo J, Huizinga TW, Heijmans BT, Frölich M, Kirkwood TB, Westendorp RG. Inflammation underlying cardiovascular mortality is a late consequence of evolutionary programming. *FASEB J* 2004a; 18: 1022-4.
- Van den Biggelaar AH, Huizinga TW, de Craen AJ, Gussekloo J, Heijmans BT, Frölich M, Westendorp RG. Impaired innate immunity predicts frailty in old age. The Leiden 85-plus study. *Exp Gerontol* 2004b; 39: 1407-14.
- Van Lieshout EM, Peters WH. Age and gender dependent levels of glutathione and glutathione S-transferases in human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1873-5.
- Van Rensbergen G, Nawrot T. Medical conditions of nursing home admissions. *BMC Geriatr* 2010; 10: 46.
- Vargas-Rojas MI, Ramírez-Venegas A, Limón-Camacho L, Ochoa L, Hernández-Zenteno R, Sansores RH. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2011; 105: 1648-54.
- Vasto S, Carruba G, Lio D, Colonna-Romano G, Di Bona D, Candore G, Caruso C. Inflammation, ageing and cancer. *Mech Ageing Dev* 2009; 130: 40-5.
- Vaughan MK, Hubbard GB, Champney TH, Vaughan GM, Little JC, Reiter RJ. Splenic hypertrophy and extramedullary hematopoiesis induced in male Syrian hamsters by short photoperiod or melatonin injections and reversed by melatonin pellets or pinealectomy. *Am J Anat* 1987; 179: 131-6.
- Vaz Fragoso CA, Enright PL, McAvay G, Van Ness PH, Gill TM. Frailty and respiratory impairment in older persons. *Am J Med* 2012; 125: 79-86.
- Venkateshappa C, Harish G, Mahadevan A, Srinivas Bharath MM, Shankar SK. Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2012; 37: 1601-14.
- Vernooy JH, Küçükaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA, Wouters EF. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1218-24.
- Víctor VM, Guayerbas N, Puerto M, De la Fuente M. Changes in the ascorbic acid levels of peritoneal lymphocytes and macrophages of mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic Res* 2001; 35: 907-16.

- Vida C, Corpas I, De la Fuente M, González EM. Age-related changes in xanthine oxidase activity and lipid peroxidation, as well as in the correlation between both parameters, in plasma and several organs from female mice. *J Physiol Biochem* 2011; 67: 551-8.
- Vida C, Giménez-Llort L, González E, Corpas I, Baeza I, De la Fuente. Study of xanthine oxidase activity in several organs from triple-transgenic mice for Alzheimer's disease. *Acta Physiol* 2009; 195: 100-1.
- Vida C, González EM, De la Fuente M. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 4656-78.
- Viña J. Glutathione: metabolism and physiological functions. Florida: CRC Press 1990.
- Viña J, Lloret A, Giraldo E, Badia MC, Alonso MD. Antioxidant pathways in Alzheimer's disease: possibilities of intervention. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 3861-4.
- Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14: 157-62.
- von Bernhardi R. Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. *Neurotox Res* 2007; 12: 215-32.
- Vrachnis N, Zygouris D, Iliodromiti Z, Daniilidis A, Valsamakis G, Kalantaridou S. Probing the impact of sex steroids and menopause-related sex steroid deprivation on modulation of immune senescence. *Maturitas* 2014; 78: 174-8.
- Vriend J, Lauber JK. Letter: Effects of light intensity, wavelength and quanta on gonads and spleen of the deer mouse. *Nature* 1973; 244: 37-8.
- Wada S, Sugioka K, Naruko T, Kato Y, Shibata T, Inoue T, Inaba M, Ohsawa M, Yoshiyama M, Ueda M. Relationship between oxidative stress and aortic valve stenosis in humans: an immunohistochemical study. *Osaka City Med J* 2013; 59: 61-7.
- Waldhauser F, Weiszenbacher G, Tatzer E, Gisinger B, Waldhauser M, Schemper M, Frisch H. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 648-52.
- Walrand S, Guillet C, Boirie Y, Vasson MP. Insulin differentially regulates monocyte and polymorphonuclear neutrophil functions in healthy young and elderly humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 2738-48.
- Walston J, Hadley EC, Ferrucci L, Guralnik JM, Newman AB, Studenski SA, Ershler WB, Harris T, Fried LP. Research agenda for frailty in older adults: toward a better understanding of physiology and etiology: summary from the American Geriatrics Society/National Institute on Aging Research Conference on Frailty in Older Adults. *J Am Geriatr Soc* 2006; 54: 991-1001.
- Wang CQ, Udupa KB, Xiao H, Lipschitz DA. Effect of age on marrow macrophage number and function. *Aging (Milano)* 1995; 7: 379-84.



- Wang GD, Lai DJ, Burau KD, Du XL. Potential gains in life expectancy from reducing heart disease, cancer, Alzheimer's disease, kidney disease or HIV/AIDS as major causes of death in the USA. *Public Health* 2013; 127: 348-56.
- Wang Z, Ciabattini G, Créminon C, Lawson J, Fitzgerald GA, Patrono C, Macclouf J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 94-100.
- Watanabe A, Shibata S, Watanabe S. Circadian rhythm of spontaneous neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of old hamster in vitro. *Brain Res* 1995; 695: 237-9.
- Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 1990; 45: M45-8.
- Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett* 1985; 187: 33-7.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 821-52.
- Wehlin L, Löfdahl M, Lundahl J, Sköld M. Reduced intracellular oxygen radical production in whole blood leukocytes from COPD patients and asymptomatic smokers. *Chest* 2005; 128: 2051-8.
- Wehr TA, Duncan WC, Sher L, Aeschbach D, Schwartz PJ, Turner EH, Postolache TT, Rosenthal NE. A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 1108-14.
- Weissman A. *Essays upon heredity and kindred biological problems*. London-New York: Oxford University Press-Clarendon 1891.
- Weksler ME. Changes in the B-cell repertoire with age. *Vaccine* 2000; 18: 1624-8.
- Wessels I, Jansen J, Rink L, Uciechowski P. Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils. *Sci World J* 2010; 10: 145-60.
- Wick G, Grubeck-Loebenstein B. The aging immune system: primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly. *Exp Gerontol* 1997; 32: 401-13.
- Wikby A, Ferguson F, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Löfgren S, Nilsson BO, Ernerudh J, Pawelec G, Johansson B. An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 556-65.
- Wikby A, Johansson B, Ferguson F, Olsson J. Age-related changes in immune parameters in a very old population of Swedish people: a longitudinal study. *Exp Gerontol* 1994; 29: 531-41.

- Wikby A, Johansson B, Olsson J, Löfgren S, Nilsson BO, Ferguson F. Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study. *Exp Gerontol* 2002; 37: 445-53.
- Wikby A, Månsson IA, Johansson B, Strindhall J, Nilsson SE. The immune risk profile is associated with age and gender: findings from three Swedish population studies of individuals 20-100 years of age. *Biogerontology* 2008; 9: 299-308.
- Williams GC. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 1957; 2: 397-411.
- Wirz-Justice A. Biological rhythm disturbances in mood disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 2006; 21: S11-5.
- Wouters EF. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 26-33.
- Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Systemic effects in COPD. *Chest* 2002; 121: 127S-30S.
- Wright CB, Sacco RL, Rundek T, Delman J, Rabbani L, Elkind M. Interleukin-6 is associated with cognitive function: the Northern Manhattan Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2006; 15: 34-8.
- Wrona D. Neural-immune interactions: an integrative view of bidirectional relationship between the brain and immune system. *J Neuroimmunol* 2006; 172: 38-8.
- Wu D, Meydani SN. Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 900-14.
- Wu D, Ren Z, Pae M, Guo W, Cui X, Merrill AH, Meydani SN. Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. *J Immunol* 2007; 179: 4829-39.
- Wu IC, Shiesh SC, Kuo PH, Lin XZ. High oxidative stress is correlated with frailty in elderly chinese. *J Am Geriatr Soc* 2009; 57: 1666-71.
- Wurtman RJ, Weisel J. Environmental lighting and neuroendocrine function: relationship between spectrum of light source and gonadal growth. *Endocrinology* 1969; 85: 1218-21.
- Wynne AM, Henry CJ, Godbout JP. Immune and behavioral consequences of microglial reactivity in the aged brain. *Integr Comp Biol* 2009; 49: 254-66.
- Xia MQ, Hyman BT. Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. *J Neurovirol* 1999; 5: 32-41.
- Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, Block GD. Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10801-6.
- Yanai M, Satomura A, Uehara Y, Murakawa M, Takeuchi M, Kumasaka K. Circannual rhythms of laboratory test parameters among chronic haemodialysis patients. *Blood Purif* 2008; 26: 196-203.

- Yancik R, Ries LG. Cancer in the aged. An epidemiologic perspective on treatment issues. *Cancer* 1991; 68: 2502-10.
- Yasui T, Maegawa M, Tomita J, Miyatani Y, Yamada M, Uemura H, Matsuzaki T, Kuwahara A, Kamada M, Tsuchiya N, Yuzurihara M, Takeda S, Irahara M. Changes in serum cytokine concentrations during the menopausal transition. *Maturitas* 2007; 56: 396-403.
- Yasukawa K, Saito T, Fukunaga T, Sekimori Y, Koishihara Y, Fukui H, Ohsugi Y, Matsuda T, Yawata H, Hirano T, *et al.* Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO cells. *J Biochem* 1990; 108: 673-6.
- Yazicioğlu MV, Avci A, Açar G, Esen Ö, Karaca O, Alici G, Özkan B, Alizade E, Bulut M, Akçakoyun M, Esen AM. Elevated uric acid and functional mitral regurgitation in dilated cardiomyopathy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; 16: 1637-41.
- Yellon SM, Fagoaga OR, Nehlsen-Cannarella SL. Influence of photoperiod on immune cell functions in the male Siberian hamster. *Am J Physiol* 1999; 276: R97-R102.
- Yesavage JA. Geriatric Depression Scale. *Psychopharmacol Bull* 1988; 24: 709-11.
- Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys* 2004; 430: 97-103.
- Yilmaz N, Simsek N, Aydin O, Yordan E, Aslan S, Eren E, Yegin A, Buyukbas S. Decreased paraoxonase 1, arylesterase enzyme activity, and enhanced oxidative stress in patients with mitral and aortic valve insufficiency. *Clin Lab* 2013; 59: 597-604.
- Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepkha SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. PERIOD2:LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 5339-46.
- Yoon SO, Yun ChH, Cheng AS. Dose effects of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* 2002; 50: 1-8.
- Youn JY, Zhang J, Zhang Y, Chen H, Liu D, Ping P, Weiss JN, Cai H. Oxidative stress in atrial fibrillation: an emerging role of NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 62: 72-9.
- Young MR, Matthews JP, Kanabrocki EL, Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Scheving LE. Circadian rhythmometry of serum interleukin-2, interleukin-10, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in men. *Chronobiol Int* 1995; 12: 19-27.
- Yurdakul AS, Taci Hoca N, Cimen F, Balci M, Atikcan S. [Circulating adhesion molecules in patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Tuberk Toraks* 2004; 52: 356-62.
- Zanni F, Vescovini R, Biasini C, Fagnoni F, Zanlari L, Telera A, Di Pede P, Passeri G, Pedrazzoni M, Passeri M, Franceschi C, Sansoni P. Marked increase with age of type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells in humans: a contribution to

- understand the relationship between inflammation and immunosenescence. *Exp Gerontol* 2003; 38: 981-7.
- Zeng M, Li Y, Jiang Y, Lu G, Huang X, Guan K. Local and systemic oxidative stress status in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Can Respir J* 2013; 20: 35-41.
- Zhang C, Rodriguez C, Spaulding J, Aw TY, Feng J. Age-dependent and tissue-related glutathione redox status in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012; 28: 655-66.
- Zhao KS, Wang YF, Guéret R, Weksler ME. Dysregulation of the humoral immune response in old mice. *Int Immunol* 1995; 7: 929-34.
- Zhu X, Gadgil AS, Givelber R, George MP, Stoner MW, Sciurba FC, Duncan SR. Peripheral T cell functions correlate with the severity of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 2009; 182: 3270-7.
- Zhu X, Raina AK, Lee HG, Casadesus G, Smith MA, Perry G. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res* 2004; 1000: 32-9.
- Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2202-10.



Anexo



## ANEXO I.

### TEST Y CUESTIONARIOS EMPEADOS EN EL ESTUDIO TOLEDO PARA UN ENVEJECIMIENTO SALUDABLE (ETES)

#### SITUACIÓN FUNCIONAL

##### ✓ INDICE DE KATZ (K)

(De 0 a 5, dependencia para las actividades básicas de la vida diaria; 6, no dependencia)

Señale la descripción adecuada para cada área de funcionamiento que figura en la lista (la palabra asistencia significa supervisión, dirección de la asistencia personal)

#### **K1.** Bañarse (con esponja o bañera o ducha).

1. No recibe asistencia (entra y sale de la bañera por sí mismo, si la bañera es el medio de limpieza habitual).
2. Recibe asistencia al lavar únicamente una parte del cuerpo (espalda o una pierna).
3. Recibe asistencia al lavar más de una parte del cuerpo (o no se lava).
4. NS
5. NC

#### **K2.** Vestirse (saca la ropa de los armarios y los cajones – incluyendo ropa interior, la ropa exterior y el manejo de los botones (incluyendo bragueros si los lleva).

1. Saca la ropa y se viste completamente sin asistencia (sin ninguna ayuda).
2. Saca la ropa y se viste sin asistencia excepto al anudarse los zapatos.
3. Recibe asistencia al sacar la ropa o al vestirse, o queda parcial o completamente desvestido.
4. NS
5. NC

#### **K3.** Ir al servicio: ir al servicio para eliminar orina y heces; lavarse a si mismo tras la eliminación y arreglarse la ropa.

1. Va al servicio, se lava, se arregla la ropa sin asistencia (puede usar un objeto de apoyo como un bastón o una silla de ruedas y puede manejar la cuña o la silla retrete, vaciándolas por la mañana).
2. Recibe asistencia para ir al servicio o al lavarse o arreglarse la ropa tras la eliminación o al usar la cuña o la silla retrete.
3. No va a la habitación denominada servicio para el proceso de eliminación.
4. NS
5. NC

#### **K4.** Desplazarse.

1. Se acuesta y se levanta de la cama así como de la silla sin ayuda (puede usar un objeto de apoyo como un bastón).
2. Se acuesta y se levanta de la cama o silla con asistencia.
3. No se levanta de la cama.
4. NS
5. NC

#### **K5.** Continencia.

1. Controla la micción y la defecación por sí mismo.
2. Sufre accidentes “ocasionales”.
3. La supervisión le ayuda a mantener el control vesical y anal; usa una sonda o es incontinente.
4. NS
5. NC

#### **K6.** Alimentarse.

1. Se alimenta sin asistencia.
2. Se alimenta solo, excepto al requerir asistencia para cortar la carne o untar el pan.



3. Recibe asistencia al alimentarse o es alimentado parcial o totalmente mediante sondas o líquidos intravenosos.
4. NS
5. NC

✓ **INDICE PARA LAS ACTIVIDADES INSTRUMENTALES DE LA VIDA DIARIA (LW)**

(De 0 a 7, dependencia para las actividades instrumentales de la vida diaria; 8, no dependencia)

**LW1.** Capacidad de usar el teléfono.

1. Utiliza el teléfono a iniciativa propia, busca y marca números...etc.
2. Marca unos cuantos números bien conocidos.
3. Contesta el teléfono pero no marca.
4. No usa el teléfono en absoluto.
5. NS
6. NC

**LW2.** Ir de compras.

1. Realiza todas las compras necesarias con independencia.
2. Compra con independencia pequeñas cosas.
3. Necesita compañía para realizar cualquier compra.
4. Completamente incapaz de ir de compras.
5. NS
6. NC

**LW3.** Preparación de comida.

1. Planea, prepara y sirve las comidas adecuadamente con independencia.
2. Prepara las comidas adecuadas si se le dan los ingredientes.
3. Calienta, sirve y prepara las comidas o prepara comidas pero no mantiene una dieta adecuada.
4. Necesita que se le prepare y sirva la comida.
5. NS
6. NC

**LW4.** Cuidar la casa.

1. Cuida la casa solo o con ayuda ocasional (pe. Trabajos duros).
2. Realiza tareas domésticas ligeras como fregar platos, hacer cama.
3. Realiza tareas domésticas ligeras pero no puede mantener un nivel de limpieza aceptable.
4. Necesita ayuda con todas las tareas de la casa.
5. No participa en ninguna tarea doméstica.
6. NS
7. NC

**LW5.** Lavado de ropa.

1. Realiza completamente el lavado de ropa personal.
2. Lava ropas pequeñas, aclara medias, etc.
3. Necesita que otro se ocupe del lavado.
4. NS
5. NC

**LW6.** Medios de transporte.

1. Viaja con independencia en transportes públicos o conduce su propio coche.
2. Capaz de organizar su transporte mediante taxis, pero no otros transportes públicos.
3. Viaja en transportes públicos si le acompaña otra persona.
4. Sólo viaja en taxi o automóvil con ayuda de otros.
5. No viaja en absoluto.
6. NS
7. NC

**LW7.** Responsabilidad sobre la medicación.

1. Es responsable en el uso de la medicación en las dosis correctas y a las horas indicadas.
2. Toma responsablemente la medicación si se le prepara con anticipación en dosis separadas.
3. No es capaz de responsabilizarse de su propia medicación.
4. NS

5. NC

**LW8.** Capacidad de utilizar dinero.

1. Maneja los asuntos financieros con independencia (presupuestos, rellena cheques y facturas, va al banco), recoge y conoce sus ingresos.
2. Maneja los gastos cotidianos pero necesita ayuda para ir al banco, grandes gastos, etc.
3. Incapaz de manejar dinero.
4. NS
5. NC

✓ **ESCALA GERIÁTRICA DE DEPRESIÓN (GDS) YESAVAGE. YS**

(De 0 a 4, no depresión; de 5 a 15, depresión)

**YS1.** ¿Está satisfecho con su vida?

1. Si
2. No

**YS2.** ¿Ha abandonado muchos intereses y actividades?

1. Si
2. No

**YS3.** ¿Siente que su vida está vacía?

1. Si
2. No

**YS4.** ¿Se siente a menudo aburrido?

1. Si
2. No

**YS5.** ¿Está de buen talante la mayor parte del tiempo?

1. Si
2. No

**YS6.** ¿Tiene miedo que le pase algo malo?

1. Si
2. No

**YS7.** ¿Se siente feliz la mayor parte del tiempo?

1. Si
2. No

**YS8.** ¿Se siente a menudo sin esperanza?

1. Si
2. No

**YS9.** ¿Prefiere quedarse en casa más que salir y hacer cosas nuevas?

1. Si
2. No

**YS10.** ¿Piensa que tiene más problemas de memoria que la mayoría?

1. Si
2. No

**YS11.** ¿Cree que es maravilloso estar vivo?

1. Si
2. No

**YS12.** ¿Piensa que no vale para nada tal y como está ahora?

1. Si
2. No

**YS13.** ¿Piensa que su situación es desesperada?

1. Si
2. No

**YS14.** ¿Se siente lleno de energía?

1. Si
2. No

**YS15.** ¿Cree que la mayoría de la gente está mejor que usted?

1. Si
2. No

✓ **ESCALA DE LINDA FRIED**

(De 3 a 5 criterios cumplidos, frágil; 1 o 2 criterios, pre-frágil; ningún criterio, no frágil)

**FRAIL1.** ¿En el último año, ha perdido usted más de 4,5 Kg. de manera no intencionada (no debido a dieta o ejercicio)?

1. Sí
2. No
3. NS
4. NC

**FRAIL2.** Durante la semana pasada, ¿Cómo de a menudo se ha sentido de la siguiente manera?

**FRAIL2a.** Sentía que todo lo que hacía era un esfuerzo.

1. Raramente o en ningún momento (menos de 1 día)
2. En algún momento o durante poco tiempo (1-2 días)
3. Una cantidad de tiempo moderada (3-4 días)
4. La mayoría del tiempo (5-7 días)

**FRAIL2b.** Sentía que no podía seguir haciendo las cosas.

1. Raramente o en ningún momento (menos de 1 día)
2. En algún momento o durante poco tiempo (1-2 días)
3. Una cantidad de tiempo moderada (3-4 días)
4. La mayoría del tiempo (5-7 días)

**FRAIL2c.** No tenía ganas de hacer nada.

1. Raramente o en ningún momento (menos de 1 día)
2. En algún momento o durante poco tiempo (1-2 días)
3. Una cantidad de tiempo moderada (3-4 días)
4. La mayoría del tiempo (5-7 días)

**FRAIL2d.** La mayor parte de estos síntomas (frail2-c) diría que:

1. Sólo le han ocurrido en la última semana
2. Le ocurren desde hace menos de tres semanas
3. Le ocurren desde hace menos de 6 meses
4. Le ocurren desde hace menos de 1 año
5. Le ocurren desde hace 1-2 años
6. Le ocurren desde hace 2-4 años
7. Le ocurren desde hace 5 años o más

**FRAIL3.** Por razones de salud o físicas, ¿Tiene usted alguna dificultad en pasear 0,8 Km. (8 campos de fútbol?)

1. Si, tiene alguna dificultad
2. No, no tiene dificultad
3. No es capaz de pasear
4. NS
5. NC

**FRAIL4.** Por razones de salud o físicas, ¿Tiene usted alguna dificultad en subir 10 escalones?

1. Si, tiene alguna dificultad
2. No, no tiene dificultad
3. No es capaz de subir
4. NS
5. NC

**FRAIL5.** Por razones de salud o físicas, ¿Tiene usted alguna dificultad en subir o bajar de un coche/autobús?

1. Si, tiene alguna dificultad
2. No, no tiene dificultad
3. No es capaz de subir/bajar
4. NS
5. NC

### **VALUACIÓN NEUROPSICOLÓGICA (ENP)**

"A continuación, le voy a hacer unas preguntas relacionadas con su memoria y concentración. Algunas de ellas pueden parecer bastantes sencillas, otras pueden ser más difíciles, pero tenemos que formularlas a todo el mundo. Si no sabe alguna respuesta no se preocupe"

### **✓ MINI-MENTAL STATE EXAMINATION (MMSE)**

(De 0 a 20 puntos, deterioro cognitivo; de 21 a 30 puntos, no deterioro cognitivo)

### **ENP-MEM1: FIJACIÓN (3 puntos)**

**ENPMEM1a:** *"Repita lo siguiente: peseta, caballo, manzana".*

0- ninguna palabra

1- repite una palabra

2- repite dos palabras

3- repite tres palabras

8- no capaz de realizar

9- se niega

*"Trate de recordarlos que más tarde se lo voy a preguntar otra vez".*

(Se puede repetir una vez más los objetos para que los aprenda)

**ENPMEM1b:** señalar número de intentos, (0 correcto al primer intento, máximo: 5)

- 0- correcto al 1er intento
- 1- un intento
- 2- dos intentos
- 3- tres intentos
- 4- cuatro intentos
- 5- cinco intentos
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPAT: ATENCIÓN Y CÁLCULO (5 puntos)**

**ENPAT1:** *“Ahora tiene que contar desde 100 hacia atrás de 7 en 7”*

(Si no comprende bien decir: *“si a 100 le quita 7 ¿Cuánto le queda?”* («respuesta») *“ahora quite 7 otra vez”*.

(93-86-79-72-65)

- 0- ninguna correcta
- 1- una resta correcta
- 2- dos restas correctas
- 3- tres restas correctas
- 4- cuatro restas correctas
- 5- cinco restas correctas
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPAT2:** Si no puede realizar la anterior prueba: *“Dígame las letras de la palabra mundo al revés”* (si no comprende *“o sea, empezando por la última letra”*) (O-D-N-U-M)

- 0- ninguna correcta
- 1- una letra correcta
- 2- dos letras correctas
- 3- tres letras correctas
- 4- cuatro letras correctas
- 5- cinco letras correctas
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENP-MEM2: RECUERDO PALABRAS. Evocación (3 puntos)**

*“Dígame cuales fueron las tres palabras que le dije hace un rato”*

- 0- ninguna palabra
- 1- recuerda una palabra
- 2- recuerda dos palabras
- 3- recuerda tres palabras
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPOT: ORIENTACIÓN TEMPORAL (5 puntos)**

**ENPOT1:** *“¿Qué día de la semana es hoy?”* (1 punto por día de error, max.3)

- 0- correcto
- 1- un día de error
- 2- dos días de error
- 3- tres o + días de error
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega.

**ENPOT2:** *“¿Qué día del mes es hoy?”* (1 punto por día de error, máx. 15)

- 0- correcto
- 1- un día de error
- 2- dos días de error
- 3- tres días de error

- 4- cuatro días de error
- 5- cinco días de error
- 6- seis días de error
- 7- siete días de error
- 8- ocho días de error
- 9- nueve días de error
- 10- diez días de error
- 11- once días de error
- 12- doce días de error
- 13- trece días de error
- 14- catorce días de error
- 15- quince o + días
- 88- no capaz de realizar
- 99- se niega

**ENPOT3: “¿En qué mes nos encontramos?”** (5 puntos por mes de error, máx. 30)

- 0- correcto
- 5- un mes de error
- 10- dos meses de error
- 15- tres meses de error
- 20- 4 meses de error
- 25- cinco meses de error
- 30- seis o + meses
- 88- no capaz de realizar
- 99- se niega

**ENPOT4: “¿En qué año estamos?”** (10 puntos por año de error, máx. 60)

- 0- correcto
- 10- un año de error
- 20- dos años de error
- 30- tres años de error
- 40- cuatro años de error
- 50- cinco años de error
- 60- 6 o + años de error
- 88- no capaz de realizar
- 99- se niega

**ENPOT5: “¿Qué hora es en este momento?”** (1 punto por ½ hora de error, máx. 5)

- 0- correcto
- 1- 30 min. de error
- 2- 60 min. de error
- 3- 90 min. de error
- 4- 120 min. de error
- 5- 180 min. de error
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPOT6: “¿En qué estación de año estamos?”**

- 0- correcto
- 1- incorrecto
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPOL: ORIENTACIÓN DE LUGAR (5 puntos)**

**ENPOL1: “¿En qué calle estamos?”**

- 0- correcto
- 1- incorrecto
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPOL2: “¿En qué n.º, piso estamos?”**

- 0- correcto

- 1- incorrecto
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPOL3:** “¿En qué ciudad estamos?”

- 0- correcto
- 1- incorrecto
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPOL4:** “¿En qué provincia estamos?”

- 0- correcto
- 1- incorrecto
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPOL5:** “¿En qué país/nación estamos?”

- 0- correcto
- 1- incorrecto
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

#### **ENPLENG: LENGUAJE**

**ENPLENG1. Nominación (2 puntos):** Nombrar un lápiz y un reloj: “*Dígame como se llama...*” (mostrar lápiz y reloj).

- 0- ninguno correcto
- 1- uno correcto
- 2- dos correctos
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPLENG2. Repetición (1 punto):** “Preste atención y repita lo siguiente: «NI SÍ, NI NO, NI PERO»”

- 0- incorrecto
- 1- correcto
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPLENG3. Comprensión (3 puntos):** Realizar una orden en tres tiempos: “*Ahora le voy a entregar este papel, tiene que cogerlo con su mano derecha, doblarlo por la mitad y ponerlo en el suelo*”

(entregar el papel una vez dada la instrucción, un punto por cada acción correctamente realizada)

- 0- ninguna correcta
- 1- una correcta
- 2- dos correctas
- 3- tres correctas
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPLENG4. Lectura (1 punto):** “Lea esto y haga lo que dice, es una orden «CIERRE LOS OJOS»”

- 0- incorrecto
- 1- correcto
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

#### **ENPPRX: PRAXIS**

**ENPPRX1. Escritura (1 punto):** “Escriba una frase, cuénteme algo por escrito”.

- 0- incorrecto
- 1- correcto
- 8- no capaz de realizar
- 9- se niega

**ENPPRX2. Dibujo (1 punto):** “Copie el siguiente dibujo”

(los pentágonos han de tener 5 ángulos, 5 lados y dos puntos de intersección).

- 0- incorrecto

- 1- correcto  
8- no capaz de realizar  
9- se niega

### **COMORBILIDAD**

Vamos ahora a revisar su historia clínica (historia de enfermedades que usted haya tenido). ¿Me podría decir si algún médico le dijo si tenía usted alguna de las siguientes enfermedades? Si usted no está seguro de su respuesta, no se preocupe, por favor dígalos.

#### **Comorbilidad Cardiovascular**

**CCV1.** ¿Algún médico le dijo que había tenido Infarto de miocardio (en el corazón) o un ataque cardíaco?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC      5. NA

**CCV2.** ¿Algún médico le dijo que había tenido Insuficiencia cardíaca (corazón débil)?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC      5. NA

**CCV3.** ¿Algún médico le dijo que había tenido Claudicación intermitente (obstrucción o estrechez en las arterias de las piernas, enfermedad de los escapates)?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

**CCV4.** ¿Algún médico le dijo que había tenido Angina de pecho (insuficiencia coronaria)?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

**CCV5.** ¿Algún médico le dijo que había tenido Fibrilación auricular?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

**CCV6.** ¿Algún médico le dijo que había tenido Hipertensión arterial? (tensión alta en las arterias)

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

**CCV7.** ¿Algún médico le dijo que había tenido Diabetes Mellitus (azúcar en la sangre)?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

**CCV8.** ¿Algún médico le dijo que había tenido problema (insuficiencia o estrechez) en alguna válvula del corazón?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

**CCV9.** ¿Algún médico le dijo que había tenido Trombosis venosa profunda o coágulos en sus piernas?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

**CCV10.** ¿Algún médico le dijo que había tenido Embolia pulmonar o coágulos en el pulmón?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

**CCV11.** ¿Ha sufrido usted alguna intervención en el corazón o en alguna arteria?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

**CCV12.** ¿Algún profesional sanitario le dijo que tenía el colesterol alto?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

#### **Accidente Cerebrovascular:**

**ACV1.** ¿Algún médico le dijo que había tenido un accidente cerebrovascular (trombosis, embolia o hemorragia en el cerebro o coágulo)?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

**ACV2.** ¿Algún médico le dijo que había tenido un Ataque isquémico transitorio (TIA o AIT, trombosis que se recuperó en menos de 24 horas)?

1. Sí      2. No      3. NS      4. NC

## ANEXO II.

A continuación se enumera la relación de trabajos derivados de la presente tesis doctoral:

1. Giménez-Llort L, **Maté I**, Manassra R, Vida C, De la Fuente M. Peripheral immune system and neuroimmune communication impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1262: 74-84.
2. **Mate I**, Madrid JA, De la Fuente M. Chronobiology of the neuroimmunoendocrine system and aging. *Curr Pharm Des* 2014; 20(29): 4642-55.
3. **Maté I**, Cruces J, Giménez-Llort L, De la Fuente M. Function and redox state of peritoneal leukocytes as preclinical and prodromic markers in a longitudinal study of triple-transgenic mice for Alzheimer's Disease. *J Alzheimer Dis* 2015; 43: 213-26.

Otras publicaciones relacionadas con la presente tesis:

1. Giménez-Llort L, Arranz L, **Maté I**, De la Fuente M. Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15(4-6): 331-43.
2. Alonso-Fernández P, Puerto M, **Maté I**, Ribera JM, De la Fuente M. Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatr Soc* 2008; 56: 2244-51.
3. Arranz L, De Castro NM, Baeza I, **Maté I**, Viveros MP, De la Fuente M. Environmental enrichment improves age-related system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res* 2010; 13(4): 415-28.
4. Alonso-Fernández P, **Maté I**, De la Fuente M. Role of neutrophils in biological age, longevity and age-related diseases. *Int J Med Biol Front* 2011; 17(6): 1-47.
5. **Mate I**, Cruces J, Vida C, Sanfeliu C, Manassra R, Giménez-Llort L, De la Fuente M. Premature immunosenescence in triple-transgenic mice for Alzheimer's Disease. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2014; 49(1): 15-9.
6. Gómez A, Sánchez-Roman I, Gomez J, Cruces J, **Mate I**, Lopez-Torres M, Naudi A, Portero-Otin M, Pamplona R, De la Fuente M, Barja G. Lifelong treatment with atenolol decreases membrane fatty acid unsaturation and oxidative stress in heart and skeletal muscle mitochondria and improves immunity and behavior, without changing mice longevity. *Aging Cell* 2014; 13(3): 551-60.